

# **POLIMORFISMOS GENÉTICOS E SUAS INTERAÇÕES NO RISCO DE HIPERTENSÃO ARTERIAL, NUMA POPULAÇÃO DA ILHA DA MADEIRA. ASSOCIAÇÃO COM AS LESÕES DOS ÓRGÃOS ALVO.**

**ANA CÉLIA DE FREITAS BETTENCOURT DE SOUSA RAMOS**

**Tese para obtenção do grau de Doutor em Medicina**

**na Especialidade em Medicina**

**na NOVA Medical School | Faculdade de Ciências Médicas**

**Setembro, 2017**

**POLIMORFISMOS GENÉTICOS E SUAS INTERAÇÕES NO RISCO DE  
HIPERTENSÃO ARTERIAL, NUMA POPULAÇÃO DA ILHA DA  
MADEIRA. ASSOCIAÇÃO COM AS LESÕES DOS ÓRGÃOS ALVO.**

**Ana Célia de Freitas Bettencourt de Sousa Ramos**

**Orientador: Professor Doutor Roberto Palma dos Reis**, Faculdade de Medicina da  
Universidade Nova de Lisboa

**Co-Orientadora: Dra. Maria Isabel Mendonça**, Unidade de Investigação do Hospital Central do  
Funchal – SESARAM.EPE

**Tese para obtenção do grau de Doutor em Medicina  
na Especialidade em Medicina  
na NOVA Medical School | Faculdade de Ciências Médicas**

**Setembro, 2017**

«O homem que move uma montanha, começa por  
carregar pequenas pedras».

Provérbio chinês

Aos meus pais, Manuel e Rosa.

Ao meu marido, Francisco.

À minha filha Isabel.

Ao meu irmão e cunhada, Aniceto e Diva.

Aos meus sobrinhos Raquel e Miguel

À minha prima Narcisa.

**A presente tese deu origem às seguintes publicações:**

**1- Sousa AC**, Palma dos Reis R, Pereira A, Borges S, Freitas AI, Guerra G, Góis T, Rodrigues M, Henriques E, Freitas S, Ornelas I, Pereira D, Brehm A, Mendonça MI. RELATIONSHIP BETWEEN ADD1 GLY460TRP GENE POLYMORPHISM AND ESSENTIAL HYPERTENSION IN MADEIRA ISLAND. Medicine. 2017 Vol:No. (Anexo 1)

**2- Sousa AC**, Mendonça MI, Pereira A, Gouveia S, Freitas AI, Guerra G, Góis T, Rodrigues M, Henriques E, Freitas S, Borges S, Pereira D, Brehm A, Palma dos Reis R. SYNERGISTIC ASSOCIATION OF GENETIC VARIANTS WITH ENVIRONMENTAL RISK FACTORS IN SUSCEPTIBILITY TO ESSENTIAL HYPERTENSION. Genetic Test Mol Biomarkers. 2017, Volume 21, Number 10. (Anexo 2)

**3- Sousa AC**, Palma dos Reis R, Pereira A, Borges S, Gouveia S, Spínola A, Freitas AI, Guerra G, Góis T, Rodrigues M, Henriques E, Ornelas I, Freitas C, Pereira D, Brehm A, Mendonça MI. A VARIANTE GENÉTICA C825T DA SUBUNIDADE  $\beta$ 3 DA PROTEÍNA G ASSOCIA-SE COM A HIPERTENSÃO ARTERIAL NUMA POPULAÇÃO PORTUGUESA. Rev Port Cardiol. (submetido para publicação). (Anexo 3)

**4- Sousa AC**, Palma dos Reis R, Pereira A, Borges S, Freitas AI, Guerra G, Gouveia S, Góis T, Nóbrega L, Rodrigues M, Henriques E, Freitas S, Ornelas I, Pereira D, Brehm A, Mendonça MI. POLIMORFISMOS GENÉTICOS ASSOCIADOS AO APARECIMENTO DE HIPERTENSÃO ARTERIAL NUMA POPULAÇÃO PORTUGUESA. Acta Med Port. (submetido para publicação). (Anexo 4)

A candidata foi responsável pela realização de 100% dos artigos mencionados, nomeadamente na sua conceção, obtenção dos dados clínicos, criação de base de dados, processamento estatístico e redação dos artigos.

A presente dissertação foi redigida de acordo com o novo Acordo Ortográfico.

## AGRADECIMENTOS

Agradece à Senhora Dr.<sup>a</sup> Isabel Mendonça e ao Senhor Professor Roberto Palma dos Reis, pela oportunidade que lhe deram em colaborar num trabalho de investigação, bem como pelo apoio, incentivo, disponibilidade e amizade incondicionais.

Um agradecimento aos elementos da Unidade de Investigação, Dra. Andreia Pereira, Dr. Sofia Borges, Téc. Carolina Freitas e Sra. Elsa Sousa. Um especial agradecimento às Sras. Dra. Sónia Freitas, Dra. Eva Henriques, Dra. Mariana Rodrigues por toda a dedicação e amizade sempre presentes.

Aos meus colegas do Serviço dos Cuidados Continuados, Dra. Teresa Gois, Dr. Francisco Ramos, Dra. Cecília Meirinho e Dr. Pierre Curado por toda a amizade dispensada.

Agradece aos colegas de Medicina Interna e de Medicina Geral e Familiar, Dra. Styliani Karamanou, Dr. Lino Nóbrega, Dr. Pedro Balza, Dra. Adelaide Spínola, Dra. Ana Isabel Freitas, Dr. Tiago Freitas, Dra. Sara Gouveia e Dr. Luís Paulino, pelo apoio na seleção dos doentes recrutados para o estudo.

Um especial agradecimento à Dra. Ana Isabel Freitas, Dra. Graça Guerra e Professor Doutor António Brehm por todo o apoio na análise genótipica dos doentes e por toda a sua disponibilidade.

Ao Serviço de Patologia Clínica agradeço toda a disponibilidade na execução dos exames analíticos, em especial ao Sr. Dr. Ilídio Ornelas, Dra. Graça Andrade e Dra. Sónia Alencastre e às técnicas Annabella Farinha, Cláudia Pita, Dina Abreu, Fátima Costa e Liliana Cardoso.

Ao Serviço de Cardiologia especialmente ao Dr. Décio Pereira, Dra. Paula Faria, Dra. Susana Gomes, Dr. Joel Monteiro e aos Téc. Estela Freitas e Jorge Sousa pelo apoio na realização dos ecocardiogramas e VOP e por toda a sua amizade.

Ao Serviço de Oftalmologia à Dra. Sandra Moniz e às Sras Ortoptistas Teresa Mendonça, Vanessa Castro, Filipa Donas Botto, Andreia Nóbrega e Carolina Neves pela sua disponibilidade na realização das retinografias.

Agradece à amiga, sempre disponível Emília Rebolo.

## RESUMO

### Introdução:

A Hipertensão essencial (EH) afeta um quarto dos adultos em todo o mundo, e estima-se o seu aumento para um terço em 2025. A sua prevalência global na população adulta portuguesa é cerca de (42%), sendo (44.4% nos homens e 40.2% nas mulheres).

A etiologia da HTA é suscetível de compreender como sendo um distúrbio multifatorial resultante de fatores ambientais e genéticos e das suas interações.

Estudos epidemiológicos revelaram que 20-40% da variação da pressão arterial é determinada geneticamente.

### Objetivos:

Avaliar quais as variantes genéticas que se associam com EH, numa população da Ilha da Madeira. Estudar as suas interações gene-gene e com os fatores de risco tradicionais (FRT), no aparecimento de HTA.

Investigar, na população de Hipertensos, quais as variantes genéticas que se associam com as lesões de órgão alvo (LOA), assim como as suas interações com os Fatores preditivos de LOA, na eclosão destas lesões.

Construção de um score genético de risco hipertensivo (SRG), calcular o seu poder preditivo e compará-lo com o risco conferido pelos FRT. Finalmente estimar o valor adicional conferido por esta associação.

### Métodos:

Com uma amostra de 1712 indivíduos com idade média de  $51 \pm 7,9$  anos (51% género masculino), fizemos um estudo caso-controlo. O grupo dos casos constituído por 860 hipertensos com idade média  $51.4 \pm 8$  anos; 53.3% género masculino). Ambos os grupos foram ajustados em termos de sexo e idade. Considerou-se ter HTA quando os indivíduos à entrada do estudo já estavam diagnosticados e /ou faziam terapêutica anti-hipertensora ou apresentavam TA  $\geq 140/90$  mmHg em mais de 3 leituras. Os controlos normotensos, não faziam qualquer medicação ou apresentavam PAS/PAD  $< 140/90$  mmHg.

Comparámos entre os grupos as suas características clínicas, parâmetros laboratoriais, assim como as 14 variantes genéticas estudadas que se associavam ao aparecimento de HTA.

Foi investigada através de duas análises de regressão logística a associação dos fatores de risco ambientais e genéticos no aparecimento de HTA.

Por *Data mining* nomeadamente *Multifactor Dimensionality Reduction* (MDR), foram analisadas as interações gene-gene e gene-ambiente no aparecimento de HTA.

Através de duas curvas ROC foi comparado o valor preditivo dos fatores de risco tradicionais e genéticos e o valor adicional desta associação, no aparecimento de HTA. Seguidamente num grupo de 600 hipertensos foram estimadas as Lesões de Órgão Alvo (LOA) e estudados os fatores genéticos e não genéticos de risco para LOA.

Por MDR, foram investigadas as interações das variantes genéticas e fatores preditores não genéticos que na análise univariada se associaram ao aparecimento de LOA. Foram construídos dois modelos de Score genético (SRG), tendo sido usado o modelo multiplicativo e avaliado através de duas curvas ROC o seu poder preditivo de HTA assim como o valor adicional da junção aos FRT. Este modelo foi aplicado aos dois géneros.

### **Resultados:**

Das variantes genéticas investigadas as que, na nossa população e no melhor modelo genético se associaram de forma significativa com a Hipertensão Arterial, foram a *ACE* rs4340 (OR 1,233 p=0,032), *ACE* 2350 rs4343 (OR 1,244, p=0,036), *ADRB1* rs1801253 (OR 1,408, p=0,033), *ADD1* rs4961 (OR 2,763 p=0,003) e *GNB3* rs5443 (OR 1,339, p=0,004). O melhor modelo de interação gene/ambiente, no risco de HTA, foi o que era constituído pela junção da variante *ADD1*, pela existência de obesidade e de diabetes na população, com OR nos dados de teste = 3,79 (IC a 95% 1,92-7,50) e com consistência de validação cruzada 10/10 (p<0,0001).

Com duas curvas AUC calculámos e comparámos a capacidade preditiva dos FRT e das 5 variantes genéticas + FRT. Existia diferença significativa (p=0,014), entre as duas curvas.

No grupo de doentes hipertensos com lesão/Insuficiência Renal o polimorfismo *ATP2B1* associou-se, de forma significativa, com a existência de Insuficiência/lesão renal (OR 3,726; p=0,028).

As variantes genéticas que se associaram na análise univariada com o aparecimento de Lesão de Órgãos Alvo, nos hipertensos, foram o *ADRB1* (p=0,005), *ATP2B1* (p=0,041) e *SCNN1G* (p=0,014) (de forma protetora).

O melhor modelo de interação entre fatores genéticos e não genéticos preditivos de Lesão de Órgãos Alvo foi o constituído pela idade, tempo de diagnóstico e pelos genes *ADRB1* e *ATP2B1* com OR no treino de 2,58 (IC a 95% 1,82 – 3,66; p<0,0001) e com consistência de validação cruzada de 10/10.

Dos dois scores elaborados, o multiplicativo mostrou melhor poder preditivo de HTA (OR 1,592; p <0,0001).

Quando aos Fatores de Risco Tradicionais se adicionava o SRGm, o incremento adicional do risco de HTA foi significativo (p=0,0004). No género masculino este acréscimo foi também significativo (p=0,004) e a sua significância manteve-se no género feminino (p=0,006), embora com um valor ligeiramente inferior.

### **Conclusões:**

Existem na nossa população da Ilha da Madeira, variantes genéticas que se associaram com HTA (*ACE*, *ACE* 2350, *ADRB1*, *ADD1*, *GNB3*).

Quando estudada a interação gene ambiente, o melhor modelo foi o que incluía a variante *ADD1*, obesidade e diabetes.

Nos hipertensos encontrámos 3 variantes genéticas que influenciaram o aparecimento de LOA: *ADRB1*, *ATP2B1* e *SCNN1G*.

O SRGm associou-se de forma significativa e independente com o aparecimento de HTA. Quando aos FRT se adicionou o SRGm o modelo apresentou incremento no seu valor preditivo de HTA.



## ABSTRACT

Essential Hypertension (EH) affects one-quarter of adults worldwide, and is estimated to increase to one-third by 2025. Its overall prevalence in the Portuguese adult population is about 42%, of which 44.4% is in men and 40.2% in women.

EH is a complex and multifactorial disorder resulting from environmental and genetic factors and their interactions.

Epidemiological studies have shown that 20-40% of blood pressure variation is genetically determined.

### Objectives

Our goal was to evaluate the genetic variants associated with EH in a population of Madeira Island, as well as to study gene-gene and gene-traditional risk factors (TRF) interactions in EH onset.

We also intend to investigate, in the hypertensive population, which genetic variants are associated with the target organ damage (TOD), as well as their interactions with the predictive factors of TOD, in the occurrence of this injuries.

Our intention was to construct a hypertensive genetic risk score (GRS), calculate its predictive power and compare it with the risk conferred by TRF in order to finally estimate the additional value conferred by this association.

### Methods

We performed a case-control study with a cohort of 1712 individuals with a mean age of  $51 \pm 7.9$  years (51% male), namely 860 patients diagnosed with EH (mean age  $51.4 \pm 8$ ; 53.3% male) and 852 normotensive controls (mean age  $50.7 \pm 7.7$ ; 48.7% male). Cases and controls were adjusted in terms of sex and age.

EH was considered when patients, at the entry to this study, were already diagnosed and/or had been on antihypertensive medication. The diagnosed hypertensives had systolic blood pressure (SBP)/diastolic blood pressure (DBP)  $\geq 140/90$  mmHg measured on at least 3 occasions. The normotensive controls had never been treated with antihypertensive medication and presented a SBP/DBP  $< 140/90$  mmHg.

We compared, between the groups, the clinical characteristics, laboratorial parameters as well as the 14 genetic variants studied that were associated with the advent of EH.

Receiver Operating Characteristic

Through two analysis of logistic regression we investigated the association of environmental and genetic risk factors in the emergence of EH.

By *Data mining*, namely *Multifactor Dimensionality Reduction* (MDR), we analysed the gene-gene and gene-environment interactions in the onset of EH.

The predictive value of traditional and genetic risk factors and the additional value of this association at the onset of EH were compared through two receiver operating characteristic (ROC) curve.

Next, in a group of 600 hypertensive patients, the TOD and genetic and non-genetic risk factors for TOD were estimated.

Using MDR, the interactions of the genetic variants and non-genetic predictive factors, which were found to be associated with TOD in the univariate analysis, were investigated.

Two genetic score models (GRS) were built, using the multiplicative model and evaluated through two ROC curves, to assess EH predictive power as well as the additional value of the TRF junction. This model was applied to both genders.

## Results

Amongst the genetic variants investigated the ones that, in our population, were significantly associated in the best genetic model with EH were: *ACE* rs4340 (OR 1.233  $p=0.032$ ), *ACE* 2350 rs4343 (OR 1.244,  $p=0.036$ ), *ADRB1* rs1801253 (OR 1.408,  $p=0.033$ ), *ADD1* rs4961 (OR 2.763  $p=0.003$ ) and *GNB3* rs5443 (OR 1.339,  $p=0.004$ ).

The best model of gene/environment interaction in the risk of EH was the one including the combination of the *ADD1* variant, the presence of obesity and diabetes in the population, with an OR in test data of 3.79 (95% CI 1.92-7.5) and a cross-validation consistency of 10/10 ( $p<0.0001$ ).

With two AUC curves we calculated and compared the predictive capacity of the TRF and the 5 genetic variants + TRF. There was a significant difference ( $p=0.014$ ) between the two curves.

In the group of hypertensive patients with lesion/Renal Insufficiency, *ATP2B1* polymorphism was significantly associated with the existence of renal insufficiency/injury (OR 3.726,  $p=0.028$ ).

The genetic variants that were associated in the univariate analysis with the appearance of TOD in hypertensive patients were *ADRB1* ( $p=0.005$ ), *ATP2B1* ( $p=0.041$ ) and *SCNN1G* ( $p=0.014$ ) (in a protective way).

The best interaction model between genetic and non-genetic predictors of TOD included age, time of diagnosis, and *ADRB1* and *ATP2B1* genes with training OR of 2.58 (95% CI 1.82-3.66,  $p<0.0001$ ) and a cross-validation consistency of 10/10.

Of the two elaborated scores, the multiplicative showed a better predictive power of EH (OR 1,592;  $p<0.0001$ ).

When SRGm was added to the TRF, the additional increase in EH risk was significant ( $p=0.0004$ ). In the male gender this increase was also significant ( $p=0.004$ ) and its significance remained in the female gender ( $p=0.006$ ), albeit with a slightly lower value.

## Conclusions

There are genetic variants in our population in Madeira Island, that were associated with EH (*ACE*, *ACE* 2350, *ADRB1*, *ADD1*, *GNB3*).

When studying the gene-environment interaction, the best model was the one that included the variant *ADD1*, obesity and diabetes.

In the hypertensive group we found 3 genetic variants that influenced the appearance of TOD: *ADRB1*, *ATP2B1* and *SCNN1G*.

When the SRGm was added to the TRF, the model showed an increase in its predictive value of HD.

# ÍNDICE

## Tema de Dissertação

Polimorfismos genéticos e suas interações no risco de Hipertensão Arterial, numa população da Ilha da Madeira. Associação com as lesões dos órgãos alvo.

|   |                              |
|---|------------------------------|
| AGRADECIMENTOS .....                    | IV                           |
| RESUMO.....                             | V                            |
| ABSTRACT .....                          | ERRO! MARCADOR NÃO DEFINIDO. |
| ÍNDICE.....                             | IX                           |
| ÍNDICE DE QUADROS.....                  | XII                          |
| ÍNDICE DE FIGURAS .....                 | XIII                         |
| ÍNDICE DE TABELAS .....                 | XV                           |
| LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÓNIMOS ..... | XVIII                        |

## CAPÍTULO I

|   |    |
|---|----|
| I. INTRODUÇÃO - FUNDAMENTOS TEÓRICOS DO ESTUDO.....                           | 3  |
| I.1. Definição de Hipertensão Arterial.....                                   | 3  |
| I.2. Epidemiologia da Hipertensão Arterial .....                              | 6  |
| I.3. Fisiopatologia e regulação da pressão arterial.....                      | 10 |
| I.3.1. Sistemas Reguladores da Pressão Arterial .....                         | 12 |
| I.3.1.1. Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona.....                         | 12 |
| I.3.1.2. Sistema Simpático Adrenérgico .....                                  | 18 |
| I.3.1.3. Outros.....  | 22 |
| I.3.2. Fisiopatologia da Hipertensão Arterial.....                            | 25 |
| I.3.2.1. Fatores de risco da Hipertensão Arterial .....                       | 25 |
| I.4. Genética da Hipertensão.....   | 34 |
| I.4.1. Hipertensão monogénica .....   | 34 |
| I.4.2. Hipertensão Arterial Essencial .....                                   | 40 |
| I.4.2.1. Estratégias para estudo genético da Hipertensão .....                | 40 |
| I.5. Genes Candidatos selecionados para estudo.....                           | 45 |
| I.5.1. Polimorfismos associados ao eixo Renina-Angiotensina-Aldosterona ..... | 45 |
| I.5.2. Polimorfismos que interferem no balanço de sal e água.....             | 45 |
| I.5.3. Polimorfismos do Sistema Simpático Adrenérgico .....                   | 45 |
| I.5.4. Polimorfismos que atuam a nível celular .....                          | 45 |

## CAPÍTULO II

|   |    |
|---|----|
| II. JUSTIFICAÇÃO PARA A DISSERTAÇÃO ..... | 61 |
|---|----|

## CAPÍTULO III

|                                    |    |
|------------------------------------|----|
| III. OBJETIVOS .....               | 65 |
| III.1. Objetivo Geral .....        | 65 |
| III.2. Objetivos Específicos ..... | 65 |

## **CAPÍTULO IV**

|   |    |
|---|----|
| IV. MATERIAL E MÉTODOS.....   | 70 |
| IV.1. Revisão Bibliográfica .....   | 70 |
| IV.2. Estudo da população.....  | 71 |
| IV.2.1. Dimensão da amostra populacional .....  | 71 |
| IV.2.2. População estudada.....   | 72 |
| IV.2.2.1. Critérios de inclusão e de exclusão dos casos e controlos .....                         | 74 |
| IV.3. Colheita de dados e instrumentos e materiais utilizados.....                                | 76 |
| IV.4. Análise bioquímica .....  | 79 |
| IV.5. Variáveis estudadas .....   | 80 |
| IV.6. Análise Genética .....  | 84 |
| IV.7. Modelos de hereditariedade genética.....  | 86 |
| IV.8. Modelos de Score de risco genético .....  | 88 |
| IV.8.1. Modelo de Score genético aditivo .....  | 88 |
| IV.8.2. Modelo de Score de risco genético multiplicativo.....                                     | 88 |
| IV.9. Análise estatística .....   | 88 |
| IV.9.1. Variáveis contínuas e categóricas .....   | 88 |
| IV.9.2. Odds ratio.....   | 89 |
| IV.9.3. Equilíbrio de Hardy-Weinberg .....  | 89 |
| IV.9.4. Análise Multivariada .....  | 90 |
| IV.9.4.1. Modelo de Regressão Logística simples / Seleção das variáveis a incluir no modelo ..... | 90 |
| IV.9.4.2. Avaliação e ajuste do modelo .....  | 91 |

## **CAPÍTULO V**

|   |     |
|---|-----|
| V. RESULTADOS.....  | 96  |
| V.1. Resultados – Introdução .....  | 96  |
| V.1.1. Caracterização da população.....   | 96  |
| V.1.2. Variantes genéticas estudadas .....  | 96  |
| V.1.3. Fatores de risco não genéticos estudados.....                                    | 97  |
| V.1.4. Estudo combinado dos fatores de risco não genéticos e genéticos .....            | 97  |
| V.1.4.1. Estudo multivariado .....  | 97  |
| V.1.4.2. Interação gene-gene .....  | 98  |
| V.1.4.3. Interação gene-ambiente.....   | 98  |
| V.1.5. Estudo genético em subgrupos – Género, Diabéticos, Obesos e Consumo de Sal... 98 |     |
| V.1.6. Estudo genético no aparecimento de lesões dos órgãos alvo nos hipertensos .....  | 99  |
| V.1.7. Distribuição do número de alelos de risco nos casos e controlos .....            | 101 |
| V.1.8. Construção de um score de risco genético para Hipertensão Arterial.....          | 101 |
| V.1.8.1. Modelos de score genético .....  | 101 |
| V.1.8.2. Comparação dos dois scores.....  | 101 |
| V.1.8.3. Valor preditivo do score genético .....  | 101 |
| V.1.8.4. Score genético multiplicativo consoante o género.....                          | 101 |
| V.2. Ordem de apresentação dos resultados.....  | 102 |
| V.3. Apresentação dos resultados.....   | 109 |
| V.3.1. Caracterização da população.....   | 109 |
| V.3.2. Variantes genéticas estudadas .....  | 113 |
| V.3.3. Fatores de risco ambientais estudados .....                                      | 121 |
| V.3.4. Estudo combinado dos fatores de risco não genéticos e genéticos .....            | 122 |

|  |     |
|--|-----|
| V.3.4.1. Estudo multivariado .....   | 122 |
| V.3.4.2. Interação gene-gene .....   | 125 |
| V.3.4.3. Interação gene-ambiente.....  | 126 |
| V.3.5. Estudo genético em subgrupos.....   | 127 |
| V.3.6. Estudo genético no aparecimento de lesões dos órgãos alvo nos Hipertensos.....                    | 138 |
| V.3.8. Construção de um score de risco genético para Hipertensão Arterial.....                           | 151 |
| V.3.8.1. Distribuição do número de alelos de risco no grupo dos hipertensos e dos<br>controles .....     | 151 |
| V.3.8.2. Score de risco genético .....   | 152 |
| V.3.8.3. Comparação dos dois scores (aditivo e multiplicativo) .....                                     | 156 |
| V.3.8.4. Valor preditivo do score genético.....  | 158 |
| <br><b><u>CAPÍTULO VI</u></b>  |     |
| VI. DISCUSSÃO GERAL.....   | 168 |
| VI.1. Tipo de estudo .....   | 168 |
| VI.2. Metodologia.....   | 169 |
| VI.2.1. Seleção dos controlos .....  | 169 |
| VI.2.2. Seleção dos casos.....   | 170 |
| VI.2.3. Critérios de inclusão e exclusão .....   | 170 |
| VI.2.4. Definição das variáveis estudadas e critérios utilizados na caracterização da<br>população ..... | 171 |
| VI.3. Caracterização da população.....   | 172 |
| VI.3.1. Características basais, clínicas e bioquímicas.....  | 172 |
| VI.3.2. Estudo genético.....   | 174 |
| VI.3.3. Fatores ambientais.....  | 177 |
| VI.4. Estudo combinado dos fatores genéticos e não genéticos .....                                       | 177 |
| VI.5. Estudo genético nos subgrupos .....  | 180 |
| VI.6. Estudo genético em relação às lesões de Órgão Alvo nos Hipertensos .....                           | 183 |
| VI.7. Score genético de risco e HTA.....   | 187 |
| <br><b><u>CAPÍTULO VII</u></b>   |     |
| VII. CONCLUSÕES.....   | 194 |
| <br><b><u>CAPÍTULO VIII</u></b>  |     |
| VIII. CONSIDERAÇÕES FINAIS SOBRE OS ACHADOS DESTA INVESTIGAÇÃO .....                                     | 200 |
| BIBLIOGRAFIA.....  | 204 |
| <br><b>ANEXOS</b>  |     |

## ÍNDICE DE QUADROS

|   |    |
|---|----|
| <b>Quadro 1</b> – Definições e classificações dos níveis da pressão arterial no consultório (mmHg)...   | 5  |
| <b>Quadro 2</b> – Estratificação do risco cardiovascular (CV) total, em categorias de baixo, moderado, alto e muito alto risco, de acordo com a PAS, a PAD, a prevalência de fatores de risco CV, Lesão de órgão alvo assintomática, diabetes, estágio de Doença renal crónica ou Doença cardiovascular sintomática. .... | 6  |
| <b>Quadro 3</b> – Distribuição do genótipo DD da <i>ACE Ins/Del</i> rs4340 em diferentes países .....   | 70 |
| <b>Quadro 4</b> – Tabela de modelos genéticos .....   | 86 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|  |     |
|--|-----|
| Figura 1 – As 10 principais causas de morte a nível mundial.....   | 7   |
| Figura 2 – Prevalência da HTA nos adultos com mais de 25 anos por região. World Health Organization 2011. ....   | 8   |
| Figura 3 – Esquema do Sistema Renina Angiotensina Aldosterona.....   | 13  |
| Figura 4 – Ação da Enzima de Conversão da Angiotensina (ECA).....  | 17  |
| Figura 5 – Ação do Sistema Nervoso Simpático .....   | 19  |
| Figura 6 – Fisiologia dos reflexos cardiovasculares.....   | 20  |
| Figura 7 – Ação da Insulina em seres humanos normais, obesos ou hipertensos.....   | 27  |
| Figura 8 – Fisiopatologia da hipertensão associada à obesidade .....   | 29  |
| Figura 9 – Variantes genéticas estudadas de acordo com o melhor modelo genético .....  | 117 |
| Figura 10 – Capacidade preditiva de HTA que aumenta à medida que se associam um maior número de variantes genéticas. ....                                    | 119 |
| Figura 11 – Capacidade preditiva de HTA de um modelo com as 13 variantes genéticas.....  | 120 |
| Figura 12 – Comparação das Curvas de ROC e respetivas AUC para os fatores de risco tradicionais de HTA (FRT) e dos FRT + 5 genes. ....                       | 123 |
| Figura 13 – Dendograma de interações gene-gene das 13 variantes genéticas.....   | 126 |
| Figura 14 – Dendograma de interações gene-ambiente das 13 variantes genéticas e os fatores ambientais. ....  | 127 |
| Figura 15 – Curvas ROC e respetivas AUC para os fatores preditores de lesões de Órgãos Alvo nos Hipertensos (FP LOA) e dos FP LOA + variantes genéticas..... | 148 |
| Figura 16 – MDR de todos fatores preditores genéticos e fatores preditores não genéticos de aparecimento de lesões dos Órgãos Alvo nos Hipertensos.....      | 151 |
| Figura 17 – Distribuição do número de alelos de risco no grupo de casos e controlos na população total.....  | 151 |
| Figura 18 – Distribuição dos alelos de risco nos casos e controlos no <i>score</i> de risco aditivo...   | 152 |
| Figura 19 – Distribuição dos alelos de risco nos casos e controlos no modelo de <i>score</i> de risco multiplicativo .....                                   | 154 |
| Figura 20 – Distribuição do Score de risco aditivo na população caso/controlo .....  | 155 |
| Figura 21 – Distribuição do Score de risco multiplicativo na população caso/controlo .....   | 156 |
| Figura 22 – Capacidade preditiva de HTA nos dois modelos de Score e sua comparação. ....   | 157 |
| Figura 23 – Curvas ROC e respetivas AUC para os fatores de risco tradicionais de HTA (FRT) e dos FRT + SGm .....   | 159 |
| Figura 24 – Distribuição do SRGm no género feminino e masculino – mediana .....  | 160 |

|  |     |
|--|-----|
| Figura 25 – Curvas ROC e respectivas AUC para os fatores de risco tradicionais de HTA (FRT) e dos FRT + SRGm no subgrupo do sexo masculino. .... | 162 |
| Figura 26 – Curvas ROC e respectivas AUC para os fatores de risco tradicionais de HTA (FRT) e dos FRT + SGm no grupo do sexo feminino. ....      | 164 |



## ÍNDICE DE TABELAS

|  |     |
|--|-----|
| Tabela 1 – SNPs incluídos no estudo.....   | 85  |
| Tabela 2 – Ensaio TaqMan® SNP Genotyping com os <i>primers</i> /sondas fornecidos. ....  | 86  |
| Tabela 3– <i>Primers</i> de PCR/sequenciação de Sanger. ....   | 86  |
| Tabela 4 – Características basais da população.....  | 110 |
| Tabela 5 – Características bioquímicas da população caso-controlo .....  | 112 |
| Tabela 6 – Frequência genotípica e Associação com Hipertensão Arterial .....   | 114 |
| Tabela 7 – Análise Univariada das variantes genéticas consoante os diferentes modelos genéticos.....   | 116 |
| Tabela 8 – Estudo das 14 variantes genéticas, posição no cromossoma, alelo de risco e a frequência do alelo <i>minor</i> . Poder da associação (OR) do genótipo e do alelo com a HTA. .... | 118 |
| Tabela 9 – Estudo gene a gene multivariado: análise de regressão logística .....   | 121 |
| Tabela 10 – Fatores de risco não genéticos de HTA: análise de regressão logística.....   | 121 |
| Tabela 11 – Fatores de risco não genéticos e genéticos de HTA: análise de regressão logística .....  | 122 |
| Tabela 12 – Curvas ROC e respetivas AUC para os fatores de risco tradicionais de HTA (FRT) e dos FRT + 5 genes. ....   | 124 |
| Tabela 13 – Modelos de interação Gene-Gene por MDR .....   | 125 |
| Tabela 14 – Melhor modelo de interação Gene-Ambiente por MDR.....  | 126 |
| Tabela 15 – Frequências genotípicas das variantes genéticas associadas à HTA, nos grupos caso-controlo da população do sexo masculino.....   | 128 |
| Tabela 16 – Variantes genéticas que se associam à HTA no género masculino - Análise Univariada consoante os diferentes modelos genéticos.....  | 129 |
| Tabela 17 – Estudo gene a gene multivariado: análise de regressão logística, na população do género masculino .....  | 130 |
| Tabela 18 – Frequências genotípicas das variantes genéticas associadas à HTA, nos grupos caso-controlo da população do sexo feminino. ....   | 131 |
| Tabela 19 – Variantes genéticas que se associam à HTA no género feminino - Análise Univariada consoante os diferentes modelos genéticos.....   | 131 |

|   |     |
|---|-----|
| Tabela 20 – Estudo gene a gene multivariado: análise de regressão logística, na população do gênero feminino .....  | 132 |
| Tabela 21 – Frequências genotípicas das variantes genéticas associadas à HTA, nos grupos caso-controlo da população diabética. ....   | 133 |
| Tabela 22 – Variantes genéticas que se associam à HTA no subgrupo dos diabéticos - Análise Univariada consoante os diferentes modelos genéticos.....                          | 133 |
| Tabela 23 – Estudo gene a gene multivariado: análise de regressão logística, na população diabética. ....   | 134 |
| Tabela 24 – Valores da ingestão de sódio em tercís e sua média em cada tercíl .....   | 135 |
| Tabela 25 – Frequência genotípica das variantes genéticas associadas à HTA, nos grupos caso-controlo da população com menor consumo de sal.....                               | 136 |
| Tabela 26 – Variantes genéticas que se associam à HTA no subgrupo dos indivíduos com menor consumo de sal - Análise Univariada consoante os diferentes modelos genéticos..... | 137 |
| Tabela 27 – Estudo gene a gene multivariado: análise de regressão logística .....   | 138 |
| Tabela 28 – Número de indivíduos e gravidade da Insuficiência renal/Lesão renal.....  | 139 |
| Tabela 29 – Frequência genotípica das variantes genéticas associadas à HTA, nos grupos com e sem IR/lesão renal. ....   | 140 |
| Tabela 30 – Variantes genéticas que se associam à insuficiência renal nos hipertensos.....  | 140 |
| Tabela 31 – Estudo gene a gene multivariado: análise de regressão logística .....   | 141 |
| Tabela 32 – Doentes com Cardiopatia Hipertensiva .....  | 142 |
| Tabela 33 – Frequência genotípica das variantes associadas à cardiopatia hipertensiva .....   | 143 |
| Tabela 34 – Variantes genéticas que se associam ao aparecimento de cardiopatia hipertensiva .....   | 143 |
| Tabela 35 – Estudo gene a gene multivariado: análise de regressão logística .....   | 144 |
| Tabela 36 – Características dos fatores de risco ao aparecimento de LOA.....  | 145 |
| Tabela 37 – Frequência genotípica das variantes genéticas no aparecimento de LOA.....   | 145 |
| Tabela 38 – Variantes genéticas que se associam ao aparecimento de LOA nos Hipertensos.   | 146 |
| Tabela 39 – Fatores de risco não genéticos associados ao aparecimento de LOA.....   | 146 |
| Tabela 40 – Estudo gene a gene multivariado: análise de regressão logística .....   | 147 |

|   |     |
|---|-----|
| Tabela 41 – Fatores preditivos genéticos e não genéticos associados ao aparecimento de Lesões dos Órgãos Alvo nos Hipertensos: análise de regressão logística .....                       | 147 |
| Tabela 42 – Curvas de ROC e respectivas AUC para os fatores preditores de lesões dos Órgãos Alvo nos Hipertensos (Fatores preditores de LOA e estes fatores + 2 variantes genéticas)..... | 149 |
| Tabela 43 – Modelos de interação entre genes e os fatores preditores de lesões dos órgãos alvo, pelo MDR.....   | 150 |
| Tabela 44 – <i>Score</i> de risco aditivo em quartis.....   | 153 |
| Tabela 45 – Comparação do 4º quartil do <i>score</i> com o 1º quartil.....  | 153 |
| Tabela 46 – <i>Score</i> de risco multiplicativo em quartis.....  | 154 |
| Tabela 47 – Comparação do 4º quartil do <i>score</i> com o 1º quartil .....   | 154 |
| Tabela 48 – Risco preditivo de HTA para o SRGa e SRGm.....  | 156 |
| Tabela 49 – Capacidade preditiva de HTA nos dois modelos de <i>Score</i> e sua comparação .....   | 157 |
| Tabela 50 – Análise multivariada de todos os FR tradicionais e o <i>score</i> multiplicativo. ....  | 158 |
| Tabela 51 – Curvas ROC e respectivas AUC para os fatores de risco tradicionais de HTA (FRT) e dos FRT + SRGm .....  | 159 |
| Tabela 52 – Distribuição do SRGm no género feminino e masculino - mediana .....   | 160 |
| Tabela 53 – Análise multivariada de todos os FR tradicionais e o <i>score</i> multiplicativo no género masculino. ....  | 161 |
| Tabela 54 – Curvas ROC e respectivas AUC para os fatores de risco tradicionais de HTA (FRT) e dos FRT + SGm no subgrupo do sexo masculino. ....   | 162 |
| Tabela 55 – Análise multivariada de todos os FR tradicionais e o <i>score</i> multiplicativo no género feminino. ....   | 163 |
| Tabela 56 – Curvas ROC e respectivas AUC para os fatores de risco tradicionais de HTA (FRT) e dos FRT + SGm no grupo do sexo feminino. ....   | 164 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÓNIMOS

|       |   |
|-------|---|
| ADH   | Hormona Antidiurética                       |
| AT1R  | Recetor Tipo I da Angiotensina II           |
| AT2R  | Recetor Tipo II da Angiotensina II          |
| AUC   | <i>Area Under Curve</i>                     |
| AVC   | Acidente Vascular Cerebral                  |
| B     | Coeficiente Beta                            |
| CT    | Colesterol Total                            |
| CV    | Cardiovascular                              |
| DAC   | Doença das Artérias Coronárias              |
| DC    | Débito Cardíaco                             |
| DCV   | Doença Cardiovascular                       |
| DMT2  | Diabetes Mellitus tipo 2                    |
| DRC   | Doença Renal Crónica                        |
| ECA   | Enzima de Conversão da Angiotensina         |
| ECA2  | Enzima de Conversão da Angiotensina 2       |
| EHW   | Equilíbrio de Hardy-Weinberg                |
| ENaC  | Canais Amiloride-sensíveis                  |
| EP    | Erro padrão                                 |
| ESC   | <i>European Society of Cardiology</i>       |
| ESH   | <i>European Society of Hypertension</i>     |
| FC    | Frequência cardíaca                         |
| FR    | Fator de Risco                              |
| FRT   | Fatores de Risco Tradicionais               |
| FRA   | Fatores Ambientais                          |
| gl    | Graus de liberdade                          |
| GWAS  | <i>Genome Wide Association Study</i>        |
| HbA1c | Hemoglobina Glicosilada                     |
| HDL-C | <i>High Density Lipoprotein-cholesterol</i> |
| HF-II | Hiperaldosteronismo familiar tipo II        |

|                |   |
|----------------|---|
| HTA            | Hipertensão Arterial                              |
| HW             | <i>Hardy-Weinberg</i>                             |
| IC             | Intervalo de confiança                            |
| ICBP           | <i>International Consortium of Blood Pressure</i> |
| IMC            | Índice de Massa Corporal                          |
| LDL-C          | <i>Low Density Lipoprotein-cholesterol</i>        |
| LOA            | Lesão de Órgão Alvo                               |
| MAF            | <i>Minor allele frequency</i>                     |
| MDR            | <i>Multifactor Dimensionality Reduction</i>       |
| OMS            | Organização Mundial de Saúde                      |
| OR             | <i>Odds Ratio</i>                                 |
| PA             | Pressão Arterial                                  |
| PAD            | Pressão Arterial Diastólica                       |
| PAS            | Pressão Arterial Sistólica                        |
| PCR            | Proteína C reativa                                |
| PNS            | <i>Parasympathetic Nervous System</i>             |
| Q              | Quartil   |
| ROC            | <i>Receiver Operating Characteristics</i>         |
| RVP            | Resistência Vascular Periférica                   |
| SNA            | Sistema Nervoso Autônomo                          |
| SNP            | <i>Single nucleotide polymorphism</i>             |
| SNS            | Sistema Nervoso Simpático                         |
| SRAA           | Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona           |
| SRG            | Score de Risco Genético                           |
| SRGa           | Score de Risco Genético aditivo                   |
| SRGm           | Score de Risco Genético multiplicativo            |
| TG             | Triglicéridos                                     |
| VOP            | Velocidade de Onda de Pulso                       |
| X <sup>2</sup> | Qui-quadrado                                      |

**CAPÍTULO I**  
**INTRODUÇÃO - FUNDAMENTOS**  
**TEÓRICOS DO ESTUDO**



## **I. INTRODUÇÃO - FUNDAMENTOS TEÓRICOS DO ESTUDO**

### **I.1. Definição de Hipertensão Arterial**

#### **Definição:**

A Hipertensão Arterial (HTA) é o aumento persistente da pressão arterial (PA), tendo sido definida pelo «*Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure*», como uma pressão arterial sistólica (PAS) persistentemente acima de 140 mmHg e / ou pressão arterial diastólica (PAD) acima de 90 mmHg. <sup>(1)</sup>

A HTA tem vindo a ser descrita como o fator de risco mais relevante para as doenças cardiovasculares e cerebrovasculares, nomeadamente o Enfarte Agudo do Miocárdio e o Acidente Vascular Cerebral, as quais se encontram entre as mais importantes causas de morbilidade e mortalidade em todo o mundo <sup>(2)</sup>.

#### **Classificação da Hipertensão Arterial**

A Hipertensão Arterial foi classificada em dois grandes grupos: hipertensão primária, conhecida como hipertensão arterial essencial e hipertensão arterial secundária, correspondendo a 95% e 5% de todos os casos de HTA, respetivamente <sup>(3)</sup>.

A hipertensão arterial, dita essencial, não tem uma causa aparente denominando-se idiopática. É uma doença reconhecidamente complexa e parece resultar de uma interação, nem sempre linear, entre fatores genéticos e ambientais. Estima-se, com base em estudos recentes que a contribuição da carga genética para a variação da pressão arterial se situa entre os 30 a 50% <sup>(4)</sup>.

Denomina-se HTA secundária, quando há uma condição pré-existente. Esta pode resultar de uma série de distúrbios como sejam hiperaldosteronismo, estenose da arterial renal, doença do parênquima renal, excesso de catecolaminas, coartação da



aorta, apneia obstrutiva do sono, síndrome de Cushing e outros distúrbios endócrinos (<sup>5</sup>).

Quanto ao modo de hereditariedade a HTA pode ser classificada como poligénica e monogénica.

A forma poligénica ou essencial é uma doença multifatorial resultando da interação de diversos fatores genéticos e ambientais.

São conhecidos diversos fatores ambientais que contribuem para o aumento da pressão arterial, como sejam o consumo excessivo de sal, consumo de álcool, tabagismo, obesidade, stress e sedentarismo. Os fatores genéticos responsáveis pela predisposição à hipertensão arterial têm sido exaustivamente investigados e vão ser também um dos objetivos deste trabalho.

As formas monogénicas de hipertensão arterial são raras ao contrário da hipertensão arterial essencial, como doença multifatorial que afeta mais de 40% da população adulta dos países industrializados (<sup>6</sup>).

A Hipertensão Arterial monogénica de transmissão mendeliana, resulta da mutação de um único gene como acontece no Hiperaldosteronismo familiar tipo I e II, na síndrome de Liddle, na síndrome de excesso aparente de mineralocorticóides, na síndrome do recetor mineralocorticóide, na síndrome de Gordon entre outros. O que estas doenças monogénicas têm em comum é um único defeito genético nas vias reguladoras de sal/água do rim. Todas estas condições levam à Hipertensão arterial sensível ao sal (<sup>7</sup>).

### **Estádios da Hipertensão Arterial**

As normas da Organização Mundial de Saúde (OMS) e da Sociedade Europeia de Hipertensão (ESH) e da Sociedade Europeia de Cardiologia (ESC) 2013 (<sup>8</sup>) preconizam os valores de classificação dos níveis de pressão arterial como:

- PA ótima (PAS < 120 e PAD < 80 mm Hg) – não existem evidências de redução de risco cardiovascular com valores de PA abaixo destes níveis.

- PA normal (PAS 120-129 e PAD 80-84 mm Hg).
- PA normal alta (PAS 130-139 e PAD 85-89 mm Hg) – com estes valores de PA, já há aumento do risco cardiovascular, sobretudo se existem outros fatores de risco cardiovascular concomitantes, ex: Diabetes.
- Hipertensão Arterial – (quando a PAS  $\geq 140$  e /ou PAD  $\geq 90$  mm Hg), é classificada em três graus diferentes: 1-2-3.
- HTA sistólica isolada – (quando PAS  $\geq 140$  e neste caso sempre com PAD  $< 90$  mmhg). É classificada em três graus diferentes (1-2-3), de acordo com os valores obtidos da PAS nos intervalos indicados na alínea anterior.

| Categoria                     | Sistólica  |      | Diastólica |
|-------------------------------|------------|------|------------|
| Ótima                         | <120       | e    | <80        |
| Normal                        | 120-129    | e/ou | 80-84      |
| Normal alta                   | 130-139    | e/ou | 85-89      |
| Hipertensão de Grau 1         | 140-159    | e/ou | 90-99      |
| Hipertensão de Grau 2         | 160-179    | e/ou | 100-109    |
| Hipertensão de Grau 3         | $\geq 180$ | e/ou | $\geq 110$ |
| Hipertensão sistólica isolada | $\geq 140$ | e    | <90        |

A categoria da pressão arterial (PA) é definida pelo nível mais elevado da pressão arterial, sistólica ou diastólica. A Hipertensão sistólica isolada deve ser classificada em graus 1, 2 e 3, de acordo com os valores da PAS nos intervalos indicados.

### Quadro 3 – Definições e classificações dos níveis da pressão arterial no consultório (mmHg)

Durante muito tempo, as recomendações de tratamento para HTA focavam-se nos valores da Hipertensão Arterial como principais variáveis a preconizar o tipo de tratamento. Hoje sabe-se que existe uma relação contínua entre a pressão arterial e a morbilidade e mortalidade cardiovascular e que esta é modificada quando existe concomitantemente outros fatores de risco cardiovascular. Além do que a presença de Lesões dos Órgãos Alvo, mesmo em fase assintomática, aumenta o risco cardiovascular.

Atualmente, segundo as *Guidelines* ESH/ESC 2013, são classificados os doentes em baixo risco, moderado risco, alto risco e muito alto risco, consoante o risco de mortalidade cardiovascular aos 10 anos <sup>(8)</sup>.

Com o objetivo de estratificar o risco cardiovascular (CV) total (**Quadro 4**), em categorias de baixo, moderado, alto e muito alto risco, preconiza-se a utilização de várias variáveis como sejam: a PAS, a PAD, a prevalência de fatores de risco CV, lesão de órgão alvo assintomática, diabetes, estágio de doença renal crónica e a doença cardiovascular sintomática.

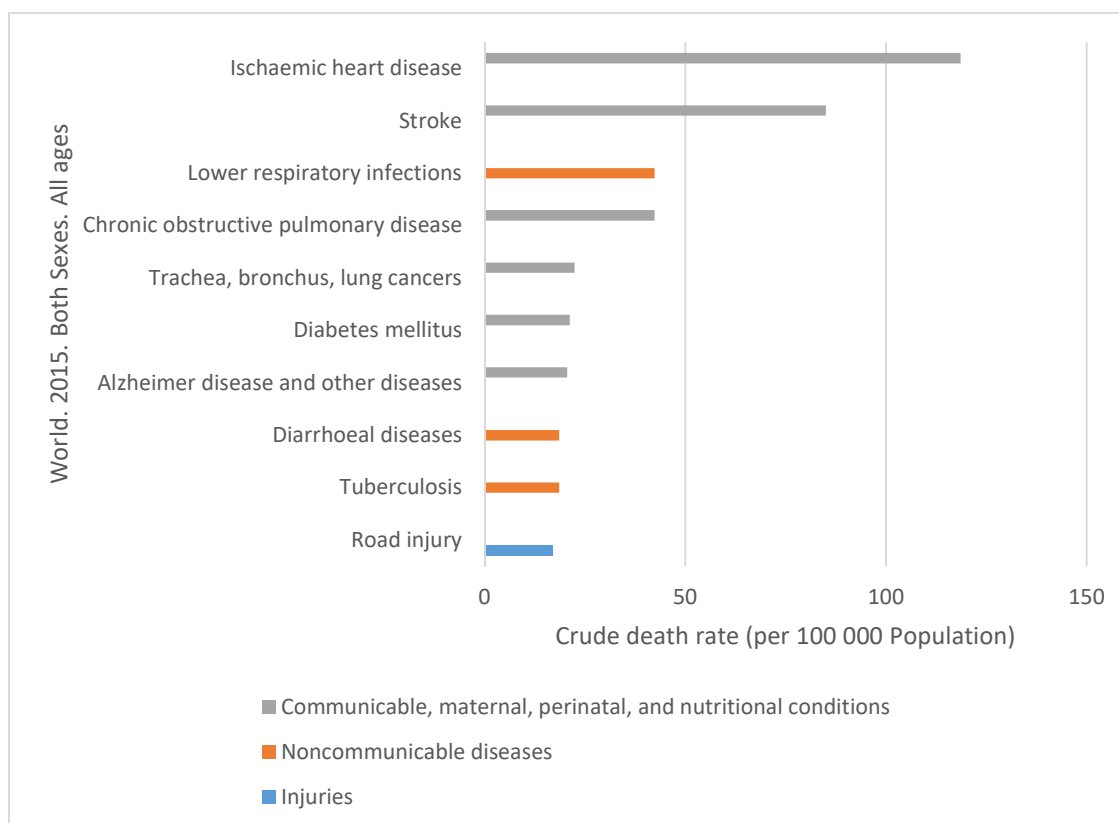
| Outros fatores de risco, lesão de órgãos assintomática | Pressão Arterial (mmHg)                    |   |   |                                       |
|--|--|---|---|---------------------------------------|
|  | Normal alta<br>PAS 130-139<br>ou PAD 85-89 | HTA Grau 1<br>PAS 140-159<br>ou PAD 90-99 | HTA Grau 2<br>PAS 160-179<br>ou PAD 100-109 | HTA Grau 3<br>PAS ≥180<br>ou PAD ≥110 |
| Sem fatores de risco                                   |  | Risco baixo                               | Risco moderado                              | Risco alto                            |
| 1-2 fatores de risco                                   | Risco baixo                                | Risco moderado                            | Risco moderado a alto                       | Risco alto                            |
| ≥3 fatores de risco                                    | Risco baixo a moderado                     | Risco moderado a alto                     | Risco alto                                  | Risco alto                            |
| LOA, DRC em fase 3 ou diabetes                         | Risco moderado a alto                      | Risco alto                                | Risco alto                                  | Risco alto a muito alto               |
| DCV, DRC sintomática fase ≥ 4 ou diabetes com LOA/FR   | Risco muito alto                           | Risco muito alto                          | Risco muito alto                            | Risco muito alto                      |

CV = cardiovascular; DCV = doença cardiovascular; DRC = doença renal crónica; FR = fator de risco; HTA = hipertensão arterial; LOA = lesão de órgão alvo; PA = pressão arterial; PAD = pressão arterial diastólica; PAS = pressão arterial sistólica.

**Quadro 4 – Estratificação do risco cardiovascular (CV) total, em categorias de baixo, moderado, alto e muito alto risco, de acordo com a PAS, a PAD, a prevalência de fatores de risco CV, Lesão de órgão alvo assintomática, diabetes, estágio de Doença renal crónica ou Doença cardiovascular sintomática.**

## I.2. Epidemiologia da Hipertensão Arterial

Segundo o relatório da Organização Mundial de Saúde da década de 2007-2017, as doenças cardiovasculares são a principal causa de mortalidade a nível mundial. Estima-se que estas doenças são responsáveis por 17,5 milhões de mortes por ano, representando cerca de 31% de todas as mortes em todo o mundo. Cerca de 80% do total das mortes por doença cardiovascular (DCV) são causadas por enfarte agudo do miocárdio e acidente vascular cerebral (AVC). A HTA representa mais de 12% destas mortes <sup>(9)</sup>.

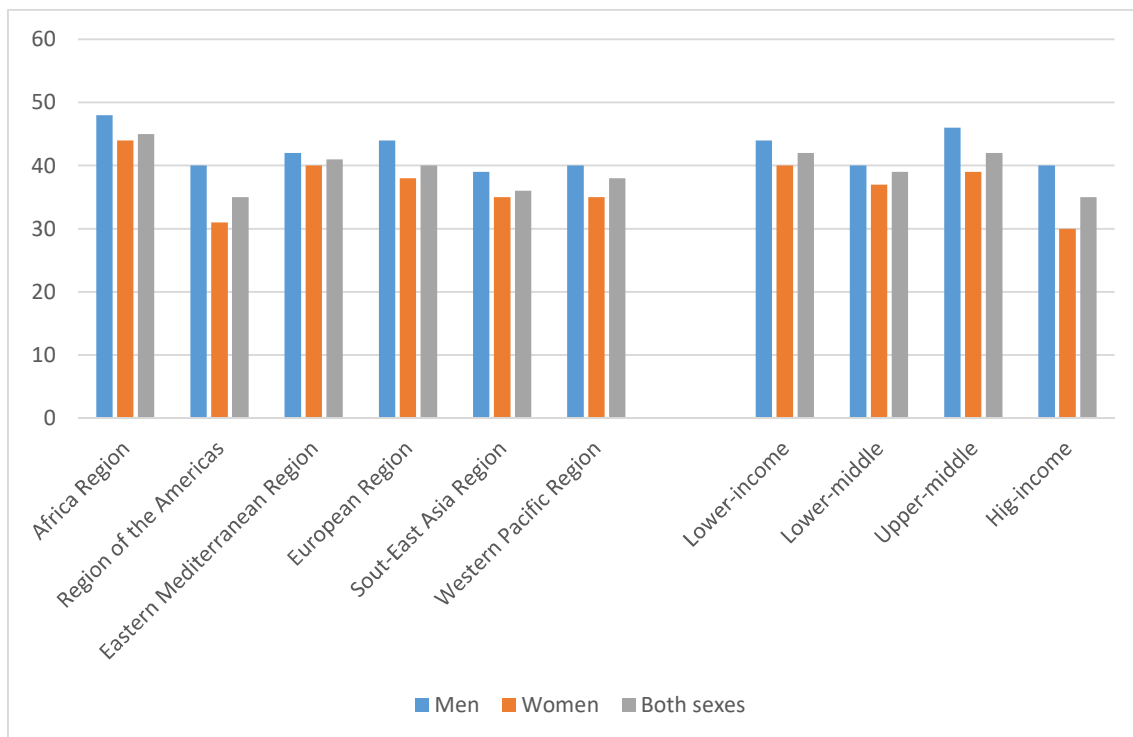


**Figura 1 – As 10 principais causas de morte a nível mundial**

A pressão arterial tem uma relação contínua e independente com a incidência de vários eventos cardiovasculares nomeadamente, acidente vascular cerebral, enfarte do miocárdio, morte súbita, insuficiência cardíaca e doença arterial periférica, assim como com a doença renal terminal. Isto verifica-se para todas as idades e grupos étnicos <sup>(8)</sup>.

Estima-se que cerca de 40% dos adultos maiores de 25 anos de idade, a nível mundial, têm hipertensão arterial segundo os dados da OMS 2008. O número de pessoas afetadas aumentou de 600 milhões em 1980 para 1000 milhões em 2008 <sup>(6)</sup>.

A maior prevalência de HTA regista-se na África com 46% dos adultos maiores de 25 anos e a menor prevalência observa-se no continente Americano com 35%. A prevalência a nível da população adulta europeia é cerca de 40% (Figura 2). Segundo os dados da OMS, a prevalência da HTA é menor nos países mais ricos em relação aos menos ricos (35% vs 40% respetivamente) <sup>(6)</sup>.



**Figura 2 – Prevalência da HTA nos adultos com mais de 25 anos por região. World Health Organization 2011.**

Nas próximas décadas a prevalência das DCV e da Hipertensão tem tendência a aumentar, devido à mudança dos estilos de vida e ao número crescente da população idosa a nível mundial <sup>(6)</sup>.

Estima-se que em 2025, cerca de 1,56 bilhões de pessoas em todo o mundo sofrerão de hipertensão arterial (com intervalo de confiança de 95%: 1,54 bilhões - 1,58 bilhões) <sup>(10)</sup>.

Com base nestes dados, torna-se imperiosa a necessidade de implementar medidas de âmbito populacional para controlo da pressão arterial.

O tratamento da HTA pode reduzir o risco de eventos cardiovasculares, incluindo acidente vascular cerebral (AVC), doença das artérias coronárias (DAC), insuficiência cardíaca e renal <sup>(11)</sup>.

Uma redução de 5 mmHg na pressão sanguínea reduz em 26% a incidência de AVC e em 15% na DAC <sup>(12)</sup>.

É atualmente consensual que o controlo dos principais fatores de risco da HTA, através das intervenções no estilo de vida e tratamento farmacológico adequado, podem reduzir a progressão deste flagelo.

O conhecimento da etiologia, e da arquitetura da hipertensão, assim como a melhor caracterização dos seus fatores genéticos, pode reduzir o impacto desta doença na saúde pública, além de abrir novos caminhos para fármacos específicos para o tratamento desta doença.

### **Epidemiologia da Hipertensão Arterial em Portugal:**

O estudo PHYSA (*Portuguese Hypertension and Salt Study*) (<sup>13</sup>), m grande estudo nacional, transversal, realizado em Portugal, sobre a prevalência e controlo da Hipertensão Arterial.

No estudo PHYSA, foi avaliada uma amostra representativa da população portuguesa, constituída por 3.720 pessoas, com idades entre os 18 e os 90 anos, recrutadas nos centros de saúde. Os resultados deste estudo, comprovam a grande prevalência desta patologia, 42,2% da população adulta portuguesa, sendo significativamente mais elevada nos homens (44,4%) em comparação às mulheres (40,2%).

A prevalência da hipertensão arterial é maior na população mais velha em comparação com a mais nova, sendo de 6,8% na população menor de 35 anos, 46,9% na com idade entre 35-64 anos e de 74,9% na acima de 64 anos, respetivamente.

Em outro estudo realizado na população portuguesa em 2003 (<sup>14</sup>) a prevalência global de hipertensão arterial era semelhante (42,1%).

Segundo os dados do Estudo Physa (<sup>13</sup>), 76,6% dos indivíduos têm conhecimento que são hipertensos, 74,9% são tratados e 42,5% controlados (com PA <140/90 mmHg). A PA média global, no Estudo Physa foi de 127,4 / 74,6 ± 17,7 / 10,5 e de 134,7 / 80,4 ± 21,2 / 14,1 mmHg no estudo de 2003.

Segundo estes estudos, a prevalência da HTA na última década em Portugal, é idêntica, no entanto há melhor controlo da doença (11,2% vs 42,5%, em 2003 e 2012 respetivamente). Isto deve-se às melhorias significativas nas taxas de prescrição de medicação anti-hipertensora ao longo desta década. Em relação aos eventos

cardiovasculares relacionados com a hipertensão arterial, houve também diminuição nesta última década <sup>(13)</sup>.

### **I.3. Fisiopatologia e regulação da pressão arterial**

A regulação da Pressão Arterial (PA) é uma das funções mais complexas do organismo, dependendo da interação de vários sistemas cardiovascular, renal, neuronal e endócrino.

A pressão arterial é determinada pelo produto do débito cardíaco (DC) e da resistência vascular periférica (RVP) <sup>(15)</sup>.

Nos indivíduos normais e nos portadores de hipertensão arterial, existe um espectro de variação do DC, com respostas concomitantes da RVP para um determinado nível de PA <sup>(16)</sup>.

Esta heterogeneidade, existe tanto em condições normais de repouso como em situações de estímulo <sup>(15)</sup>.

O Débito Cardíaco é influenciado pela contratilidade e o relaxamento do miocárdio, pelo volume sanguíneo circulante, pelo retorno venoso e pela frequência cardíaca. A RVP é determinada por vários mecanismos vasoconstritores e vasodilatadores, como sejam o sistema nervoso simpático, o sistema renina angiotensina aldosterona e a ação do endotélio vascular <sup>(16)</sup>.

A RVP depende também da espessura da parede das artérias, havendo nos vasos em que há espessamento das suas paredes, uma potencialização ao estímulo vasoconstritor <sup>(17)</sup>.

Em muitos pacientes portadores de HTA, a elevação da PA é decorrente do aumento da RVP, enquanto noutros é devida ao aumento do DC <sup>(17)</sup>.

### **Hipertensão com aumento do débito cardíaco:**

Alguns hipertensos, geralmente jovens, têm uma forma de HTA chamada de hipertensão hiperdinâmica, com aumento do DC e reduzida RVP <sup>(17)</sup>.

Muitos desses indivíduos têm taquicardia em repouso, enquanto outros têm aumento da PA sistólica e volume circulante elevado. Provavelmente isto deve-se ao excessivo estímulo do miocárdio pelo sistema nervoso simpático. Estima-se que este subgrupo de hipertensos corresponde a menos de 5% dos pacientes com HTA <sup>(17)</sup>.

### **Hipertensão com aumento das RVP:**

Os pacientes idosos com HTA, têm aumento da RVP e DC normal ou reduzido <sup>(18)</sup>.

Como muitos pacientes idosos são portadores de aterosclerose, há maior RVP, levando ao aumento da PA sistólica nesses pacientes. A diminuição da complacência da aorta e o aumento reflexo da onda de pulso, causam elevação da PA sistólica, o que contribui para hipertrofia ventricular esquerda <sup>(18)</sup>.

### **Hipertensão com alterações hemodinâmicas mistas:**

Carateristicamente nos doentes hipertensos existe uma combinação entre o aumento do DC com o aumento da RVP. Geralmente nos hipertensos jovens encontramos um aumento do DC e na grande maioria dos idosos o DC é reduzido. Existe, no entanto muitas interligações entre esses dois perfis hemodinâmicos <sup>(18)</sup>.



### **I.3.1. Sistemas Reguladores da Pressão Arterial**

#### **I.3.1.1. Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona**

O Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA), é a chave da regulação da pressão arterial, da hemodinâmica renal e da homeostase do sal/água <sup>(19)</sup>.

O envolvimento do SRAA na fisiopatologia da Hipertensão Arterial está bem estabelecido <sup>(20)</sup>.

Duas formas distintas do SRAA, mas com funções similares, foram identificadas: O SRAA endócrino e o local. No SRAA endócrino inicia-se principalmente no aparelho justaglomerular dos nefrônios, enquanto que para o SRAA local ocorre a nível endotelial <sup>(21)</sup>.

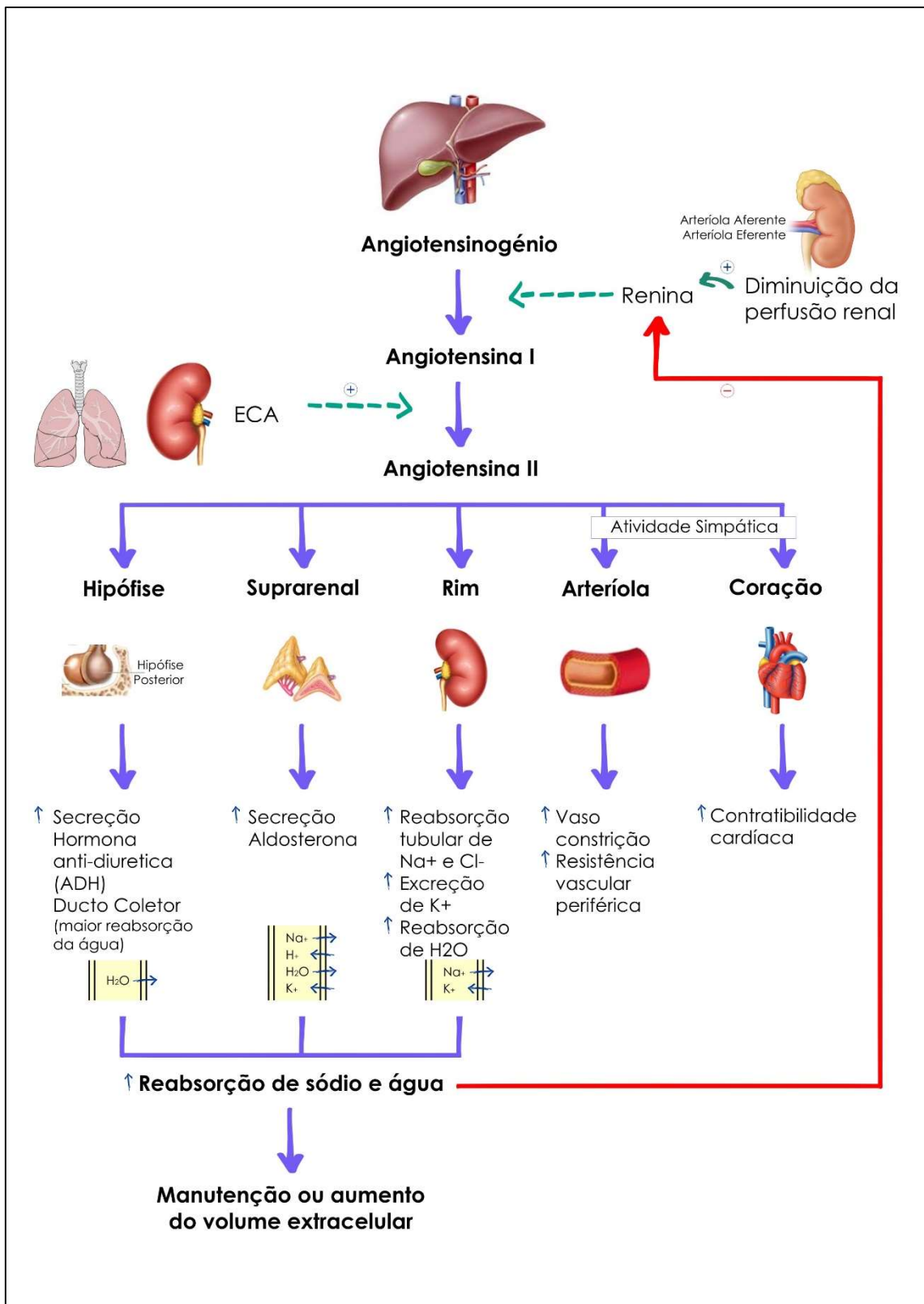


Figura 3 – Esquema do Sistema Renina Angiotensina Aldosterona

O SRAA endócrino é um eixo, no qual cada componente da cascata é produzido por diferentes órgãos, havendo interação de vários sistemas orgânicos, com o objetivo de manter a estabilidade hemodinâmica. Os rins são os órgãos responsáveis por este mecanismo enzimático/hormonal, estando assim, relacionados diretamente com a regulação da pressão-arterial <sup>(21)</sup>.

A nível das células justaglomerulares que circundam a arteríola aferente do glomérulo renal, a renina, uma protéase aspártica, é sintetizada a partir de um precursor inativo a pró-renina. Tanto a pró-renina como a renina ativadas são armazenadas nos grânulos das células do aparelho justaglomerular. A libertação da renina é regulada em resposta a uma variedade de estímulos como sejam: 1) a diminuição do fluxo da artéria aferente do glomérulo renal, 2) a diminuição do sódio plasmático (estimula a mácula densa do aparelho justaglomerular do nefrónio), 3) estimulação simpática (estimulação beta 1-adrenérgica das células justaglomerulares), 4) fatores locais como as prostaglandinas, a dopamina, a adenosina e o óxido nítrico (NO) e por 5) «*feedbck*» negativo pela ação direta da Angiotensina II nas células justaglomerulares.

A pró-renina tem uma baixa atividade intrínseca, de menos de 3% da atividade da renina completamente ativada.

O principal local de produção de renina são as células justaglomerulares do nefrónio. A pró-renina é produzida no rim, glândulas suprarrenais, ovários, testículos, placenta e retina <sup>(22)</sup>.

O mecanismo primário pelo qual o RAAS contribui para mudanças agudas na pressão arterial e homeostase de volume é a regulação da libertação de renina na circulação <sup>(22)</sup>.

A Renina converte o Angiotensinogénio (produzido no fígado) em Angiotensina I. A Angiotensina I é um péptido intermediário (uma substância inativa), que é convertido nos pulmões, no octapeptídeo Angiotensina II pela ação de uma enzima catalisadora, a Enzima de conversão da angiotensina (ECA) <sup>(23)</sup>.

A Angiotensina II atua sobre vários tecidos e órgãos, sendo que a sua ação deve-se essencialmente a três mecanismos – aumento da frequência cardíaca, da resistência vascular periférica e do volume sanguíneo, levando ao aumento da pressão arterial <sup>(24)</sup>.

A Angiotensina II, exerce os seus efeitos fisiológicos através de dois subtipos de recetores específicos, duas isoformas estruturalmente distintas, localizadas na membrana celular: o recetor tipo I da Angiotensina II (AT1R) e o recetor tipo II da Angiotensina II (AT2R). A maioria dos seus efeitos fisiológicos é mediada pelo recetor AT1R, que é um membro da família dos recetores acoplados à proteína G e está distribuído em muitos tipos de células <sup>(23)</sup>.

Através dos recetores AT1R presentes nas arteríolas, a Angiotensina II, atua sobre as células do músculo liso que circundam o endotélio vascular, causando vasoconstrição <sup>(25)</sup>.

Esta por sua vez, leva a nível sistémico à diminuição do diâmetro das arteríolas e consequentemente aumento da resistência ao fluxo sanguíneo e a nível renal à diminuição do fluxo de sangue no rim (intra-renal), aumentando assim a reabsorção de sal e água.

O recetor tipo 2 (AT2R) é abundante durante a vida fetal e os seus níveis decrescem acentuadamente no período pós-natal. Há evidências que apesar dos baixos níveis de expressão no adulto, o recetor AT2 pode mediar a vasodilatação (via bradicinina e libertação de óxido nítrico), os efeitos antiproliferativos e apoptóticos no músculo vascular liso e inibe o crescimento e remodelação cardíaca <sup>(26)</sup>.

Por outro lado, a Angiotensina II estimula o sistema nervoso simpático, através da ativação de recetores adrenérgicos. Estes recetores, localizados no tecido cardíaco e no músculo liso, são estimulados pela adrenalina e noradrenalina. Na presença de Angiotensina II, há aumento da libertação de noradrenalina e diminuição da sua reabsorção, estimulando os adrenorecetores  $\beta_1$  adrenérgicos no tecido cardíaco, o que induz ao aumento da frequência cardíaca. Esta por sua vez, leva ao aumento do débito cardíaco e consequentemente da pressão arterial <sup>(24, 27)</sup>.

Sob a ação angiotensina II a nível do córtex da glândula suprarrenal e da glândula pituitária, há maior retenção de sal e água pelo rim.

A angiotensina II provoca a libertação de aldosterona pelo córtex da glândula suprarrenal, fazendo com que haja reabsorção de sal a nível renal, enquanto que a nível da glândula pituitária, causa libertação da hormona antidiurética (ADH), também

conhecida como vasopressina), o que aumenta a permeabilidade do nefrônio à água, promovendo a reabsorção de água (<sup>28</sup>, <sup>24</sup>).

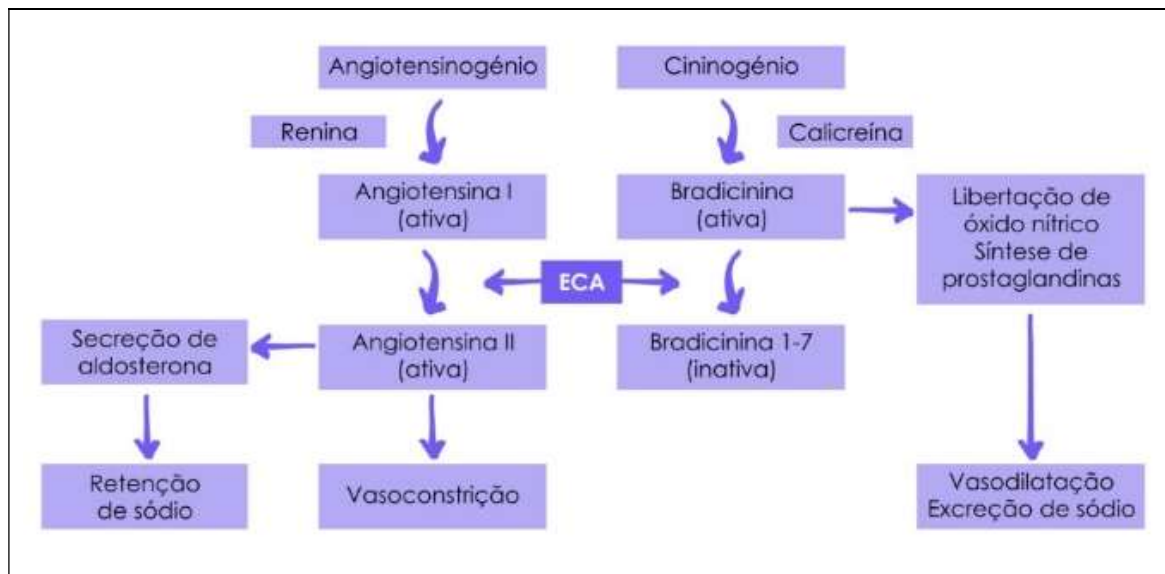
Estes mecanismos, através da retenção de água, causam um aumento do volume sanguíneo, elevando assim, o débito cardíaco e conseqüentemente a pressão arterial.

A Angiotensina II tem meia-vida muito curta, porque é rapidamente degradada pelas angiotensinases em peptídeos com reduzida atividade biológica (<sup>23</sup>).

Evidências científicas sugerem que a Angiotensina exerce ação tanto pela via endócrina (como hormônio circulante), como pela via parácrina (secretado de uma célula para outras) ou autócrina (produzido pela célula para si mesma) (<sup>29</sup>).

A Enzima de Conversão da Angiotensina (ECA) é secretada nos pulmões e no rim. Vários estudos sugerem que as células endoteliais têm capacidade de secretar ECA podendo esta enzima produzir-se no endotélio vascular.

A ECA, é a enzima que converte a Angiotensina I em Angiotensina II e metaboliza a Bradicinina, uma substância vasodilatadora, em bradicinina 1-7, que é um metabolito inativo. A Bradicinina atua como uma substância vasodilatadora, através da libertação doutros mediadores vasculares importantes, como sejam: o óxido nítrico (um fator de relaxamento derivado do endotélio), da prostaciclina e o ativador do plasminogénio tecidual. Portanto a ECA aumenta a produção de um potente vasoconstritor, a Angiotensina II e promove a degradação de um vasodilatador, a Bradicinina. A ação da ECA induz vasoconstrição e a inibição da ECA conduz à vasodilatação e natriurese (<sup>21</sup>).



**Figura 4 – Ação da Enzima de Conversão da Angiotensina (ECA)**

A Enzima de Conversão da Angiotensina 2 (ECA2), descoberta por Tipnis et al<sup>(30)</sup> é uma enzima homóloga da ECA, mas com ação diferente desta, sugerindo outro mecanismo na regulação do SRAA. A ECA2 encontra-se no rim, coração e em outros órgãos e facilita a conversão da Angiotensina II em Angiotensina 1-7 (Ang- (1-7)) e da Angiotensina I em Angiotensina 1-9 (Ang- (1-9)).<sup>(30)</sup>

Crackower MA et al<sup>(31)</sup>, descreveram em ratos que a ECA2 se relacionava com a redução da contratilidade cardíaca e da pressão intraventricular e aórtica<sup>(31)</sup>.

O coeficiente de ECA/ECA2 está aumentado no córtex renal dos hipertensos em comparação com os não hipertensos<sup>(32)</sup>.

O ECA2 e os peptídeos vasoativos, Ang- (1-7) e Ang- (1-9), são componentes de uma nova via do SRAA não-canônica protetora, que neutraliza os efeitos proliferativos e hipertensivos do eixo clássico SRAA. Numerosos estudos têm provado o efeito da ECA2 e destes peptídeos, na regulação da pressão arterial e remodelação cardiovascular e renal<sup>(33)</sup>.

A aldosterona é sintetizada na zona glomerular do córtex da glândula da suprarrenal e é a principal hormona mineralocorticóide circulante. Atua a nível renal via recetores dos mineralocorticóides, induzindo a reabsorção de água e sódio e aumenta a excreção de

potássio. A sua ação dá-se essencialmente atuando na regulação dos canais epiteliais de sódio ou canais amiloride-sensíveis (ENaC), que estão presentes nos ductos coletores <sup>(34)</sup>, contribuindo assim, para a regulação da homeostase e do volume de fluido corporal.

A Aldosterona, através de dois mecanismos, também modula o tônus vascular, pois aumenta a resposta vasopressora às catecolaminas e diminui a resposta vasodilatadora à acetilcolina, além do que estimula os recetores de Angiotensina II <sup>(35)</sup>.

### **I.3.1.2. Sistema Simpático Adrenérgico**

O Sistema Nervoso Autónomo (SNA) compreende o sistema nervoso simpático (SNS) e parassimpático (PNS) e tem papel importante no controlo da pressão arterial.

A sua ação centraliza-se na estabilidade do sistema cardiovascular através do controle da pressão arterial, do volume sanguíneo e dos sinais dos quimiorrecetores <sup>(36)</sup>.

Os mecanismos pelos quais a estimulação SNS provoca aumento na pressão arterial são complexos, com interação de vários sistemas, que resultam no aumento do débito cardíaco, da resistência vascular e na retenção de líquidos <sup>(28)</sup>.

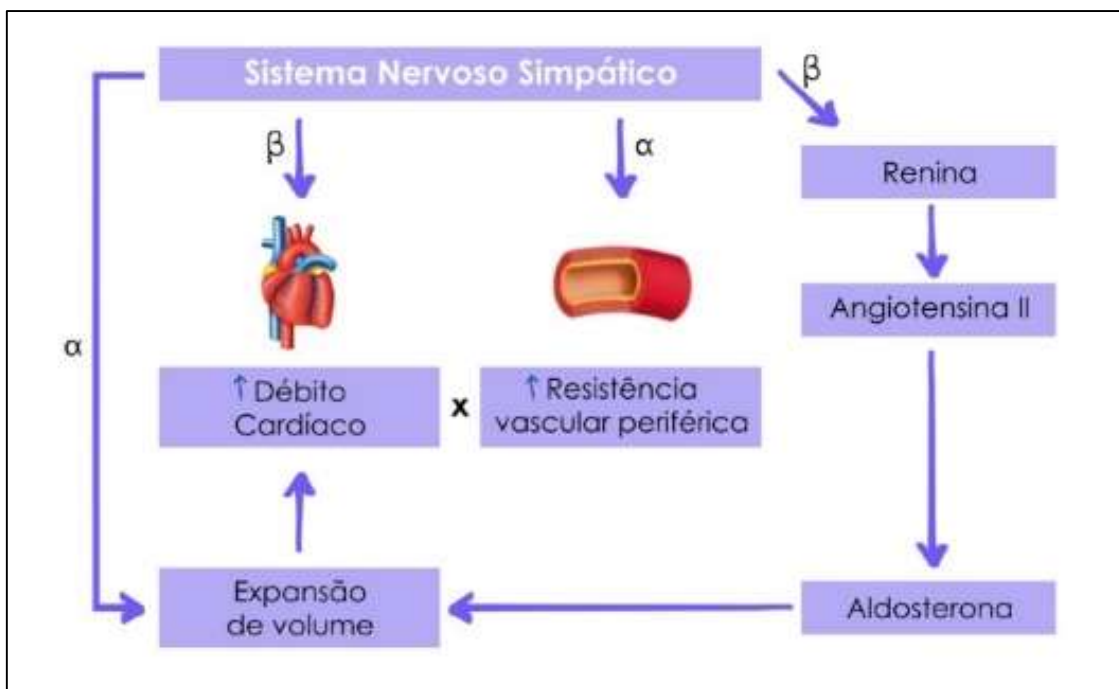
A rotura desse sistema, por exemplo, na hiperatividade no sistema nervoso simpático, aumenta a pressão arterial e envolve o desenvolvimento e a manutenção da pressão arterial elevada <sup>(36)</sup>.

#### **Ação dos Recetores vasculares adrenérgicos:**

O sistema nervoso simpático (SNS) pela ação das catecolaminas (adrenalina e noradrenalina), ativa os recetores adrenérgicos localizados em vários órgãos e sistemas.

A noradrenalina é libertada pelas fibras nervosas simpáticas pós-ganglionares e tem uma ação importante no coração e nas estruturas vasculares. Estimula os recetores adrenérgicos Beta 1 a nível do músculo cardíaco, aumentando o débito cardíaco, através da elevação da frequência cardíaca e da fração de ejeção.

Os recetores alfa 1 e alfa 2 estão localizados no músculo liso, na parede das arteríolas. Sob a ação das catecolaminas nesses recetores, há contração do músculo liso, levando à vasoconstrição das arteríolas. A consequente diminuição do diâmetro da arteríola, resulta em maior resistência vascular e contribui para um aumento da pressão arterial. A inibição da estimulação do SNS tem o efeito oposto na pressão sanguínea, pois inibe a vasoconstrição do músculo liso (<sup>37</sup>).



**Figura 5 – Ação do Sistema Nervoso Simpático**

A hiperatividade do SNS tem sido implicada no desenvolvimento da hipertensão arterial. Vários investigadores demonstraram que doentes hipertensos têm maior ativação do SNS, com aumento da frequência cardíaca basal e da pressão arterial em resposta aos estímulos. Esta hiperatividade resulta do aumento dos impulsos nervosos para os centros cerebrais, maior resposta hipotalâmica e desregulação dos barorreceptores (<sup>38</sup>).

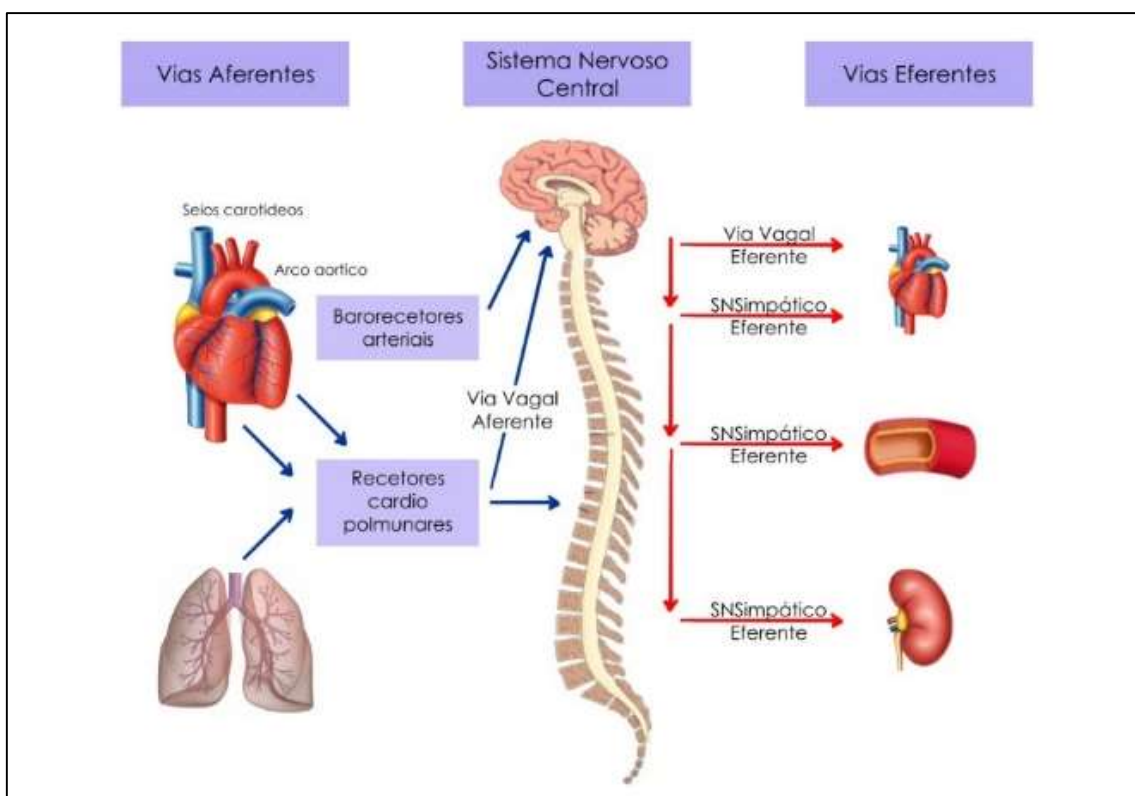


### **Estimulação simpática do Sistema Renina angiotensina aldosterona (SRAA):**

O SNS também estimula o SRAA através do estímulo Beta-adrenérgico nas células justaglomerulares levando à liberação de Renina e desencadeando toda a cascata do SRAA, finalizando na retenção de volume <sup>(39)</sup>.

### **Fisiologia dos reflexos cardiovasculares:**

Os reflexos cardiovasculares estão envolvidos na modulação da atividade simpática e a disfunção destes reflexos autonômicos estão na gênese e na manutenção da hipertensão. Os três maiores arcos reflexos cardiovasculares são: os barorreceptores arteriais (de alta pressão), os receptores cardiopulmonares (de baixa pressão) e os quimiorreceptores arteriais <sup>(40)</sup>.



**Figura 6 – Fisiologia dos reflexos cardiovasculares**

### **Os Barorreceptores arteriais:**

A manutenção da pressão arterial exige um controlo rígido, mediado por mecanismos periféricos e centrais, sendo que os barorreceptores arteriais desempenham um papel muito importante.

Os barorreceptores são mecanorreceptores constituídos por terminações nervosas que se situam na parede dos grandes vasos, como sejam a aorta e as carótidas. São estimulados pelas deformações das paredes destes vasos, provocada pela onda de pressão sanguínea e pelas características elásticas da parede.

Aquando a elevação da PA, há grande deformação da parede com consequente ativação dos barorreceptores. Estes sinais são conduzidos ao sistema nervoso central (SNC), mais especificamente ao núcleo do trato solitário, via nervo glossofaríngeo (fibras carotídeas) e vago (fibras aórticas). Os neurónios secundários do núcleo do trato solitário excitam os neurónios pré-ganglionares do parassimpático, localizados no núcleo dorsal motor do vago e no núcleo ambíguo. Por via vagal eferente estimulam os neurónios pós-ganglionares intramurais cardíacos, levando assim, ao aumento da atividade vagal e diminuição da frequência cardíaca. O tónus simpático para o coração, rins e vasos, por outro lado, é reduzido, uma vez que outros neurónios do núcleo do trato solitário, quando estimulados pelo aumento da PA, excitam o bulbo ventrolateral caudal que inibe os neurónios pré-motores simpáticos do bulbo ventrolateral rostral. Ocorre assim, redução da contratilidade cardíaca e bradicardia, com diminuição da resistência vascular periférica e renal, levando à redução da pressão arterial <sup>(40)</sup>.

### **Os Recetores cardiopulmonares:**

As mudanças da pressão nas câmaras cardíacas ativam os três grupos de recetores cardiopulmonares.

O primeiro grupo de recetores, localizado nas junções veno-atriais são ativados pelo enchimento e pela contração das aurículas. Estes recetores por via vagal aferente, ligam-se ao SNC. A distensão mecânica das junções veno-auriculares provoca um aumento da frequência cardíaca pela atividade simpática do nodo sino-auricular.

O segundo grupo de recetores cardiopulmonares estão difusamente distribuídos em todas as câmaras cardíacas. Comportam-se, quando ativados, como mecanorreceptores, reduzindo a atividade simpática e aumentando a atividade vagal do coração.

O terceiro grupo de recetores cardiopulmonares aferentes, estão também difusamente distribuídos por todas as câmaras cardíacas e estimulam a medula espinhal via simpática aferente cardíaca. São ativados por estímulos mecânicos ou por substâncias químicas aplicadas diretamente no epicárdio <sup>(40)</sup>.

#### **Quimiorrecetores arteriais:**

Os quimiorrecetores periféricos representam um importante grupo de estimulação aferente que participam no controlo da função autonómica. Estão localizados nos corpúsculos aórticos e carotídeos, detetam as variações das pressões parciais do O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> e pH e desencadeiam respostas homeostáticas a fim de corrigi-las <sup>(40)</sup>.

#### **I.3.1.3. Outros**

#### **Disfunção do Endotelial e Substâncias Vasoativas:**

O envolvimento do endotélio na modulação da contratilidade da musculatura lisa vascular, foi confirmado com os estudos de Furchgott e Zawadzki <sup>(41)</sup>, que ao estudarem o relaxamento de fragmentos da aorta pré-contraídos com norepinefrina em resposta à infusão de acetilcolina, observaram que, só aqueles com integridade do endotélio, respondiam à infusão da acetilcolina. Quando o endotélio estava desnudado, não havia relaxamento ou vasoconstrição do vaso em resposta à acetilcolina <sup>(42)</sup>, concluindo assim, que o endotélio produzia fatores que atuavam sobre as células musculares lisas vasculares, modulando a atividade da parede vascular. Esses fatores produzidos pelo endotélio são uma variedade de estruturas químicas tais como óxido nítrico, radicais livres, moléculas de adesão, endotelina e fatores de crescimento <sup>(42)</sup>.

Estes fatores derivados do endotélio interagem entre si, com efeitos opostos e outras vezes sinérgicos, produzindo uma complexa regulação endotelial do tônus vascular <sup>(42)</sup>.

Um dos produtos mais importantes produzido nas células endoteliais é o óxido nítrico. A síntese de óxido nítrico realiza-se por ação da enzima, a óxido nítrico sintetase a partir do aminoácido L-arginina com produção de óxido nítrico e L-citrulina. O óxido nítrico controla o tônus vascular – por relaxamento do músculo liso da parede vascular levando à vasodilatação <sup>(36)</sup>.

Vários estudos foram realizados no sentido de estudar a ação do sistema do óxido nítrico, na redução da função vasodilatadora endotelial observada em pacientes com HTA. Nestes há comprometimento da atividade do óxido nítrico que leva à disfunção endotelial nestes doentes <sup>(42)</sup>.

A disfunção endotelial observada em hipertensos deve-se à diminuição da atividade do óxido nítrico que resulta da redução da sua síntese, aumento da sua degradação ou integração com outras substâncias derivadas do endotélio <sup>(42)</sup>.

Ao contrário do óxido nítrico, a endotelina é um potente vasoconstritor, produzido a nível endotelial. Existem três isoformas de endotelina (ET-1, ET-2, ET-3) que ativam recetores específicos do músculo liso vascular, que estão acoplados à proteína G, levando à libertação de cálcio do retículo sarcoplasmático, o que induz à vasoconstrição <sup>(36)</sup>.

A ET-1 é a que tem maior importância nas doenças cardiovasculares por ser produzida nas células endoteliais e pela sua potente propriedade vasoconstritora. Está relacionada com a elevação da PA e também com as doenças dos órgãos alvo envolvidos na HTA <sup>(43)</sup>.

A atividade da ET-1 leva a: efeito miocárdio inotrópico positivo, fibrose do músculo cardíaco, vasoconstrição coronária, secreção de peptídeo natriurético atrial, vasoconstrição renal, redução do ritmo de filtração glomerular e da excreção urinária de sódio, aumento da secreção de aldosterona, vasoconstrição, broncoespasmo pulmonar e hipertrofia vascular <sup>(44)</sup>.

A Bradicinina é uma importante substância vasoativa sistémica que atua como um potente vasodilatador. É um produto não-peptídico do sistema cinina-caliceína, tendo papel importante na coagulação, inflamação e na regulação da pressão arterial <sup>(45)</sup>.

A calicreína plasmática atua sobre o cininogénio induzindo à formação das cininas. A bradicinina atua nos recetores da bradicinina 1 e 2 (B1 e B2) que se expressam normalmente em algumas células, como as do músculo liso, sendo responsáveis pelo efeito vasodilatador <sup>(45)</sup>.

O principal papel do miocárdio na pressão arterial deve-se à sua ação como uma estrutura mecânica, no entanto também exerce funções endócrinas e parácrinas. O péptido natriurético auricular é uma hormona secretada pelos miócitos do miocárdio em resposta ao alongamento, provocado pelo aumento do volume sanguíneo e tem importante papel na regulação da pressão arterial <sup>(46)</sup>.

O péptido natriurético auricular modula o equilíbrio dos fluidos e eletrólitos, com consequente aumento da excreção de sódio e água no rim, através da ligação específica a um recetor de superfície celular, denominado recetor tipo A do peptídico natriurético. Isto provoca a redução do volume sanguíneo e a diminuição da pressão arterial <sup>(47)</sup>.

Um outro mecanismo importante na regulação da pressão arterial é o sistema dopaminérgico. A dopamina é sintetizada nos túbulos proximais renais e inibe o transporte de sódio através destes, reduzindo a sua reabsorção. O sistema dopaminérgico exerce a sua função, por meio da ativação de recetores de superfície celular acoplados às proteínas G. A estimulação destes recetores regulam a excreção de água e eletrólitos, atuando indiretamente na hemodinâmica renal e na libertação de hormonas e peptídeos vasoativos. As proteínas G acopladas a recetores do tipo quinase (GRKs), têm uma ação importante na fosforilação e dessensibilização dos recetores da dopamina <sup>(48, 49)</sup>.

As proteínas G também desempenham um papel fundamental nos processos de sinalização intracelular. O aumento da atividade de canais de sódio e hidrogénio levam à reabsorção do sódio pelos túbulos renais, o que induz ao incremento do volume sanguíneo, e consequentemente elevação da pressão arterial. Siffert et al (2005) <sup>(50)</sup>, estudaram em culturas de linfócitos de pacientes hipertensos, as vias de estímulo e resposta, verificando um aumento da sinalização por íões de cálcio e a formação de mensageiros intracelulares secundários, em resposta ao aumento da ativação das proteínas G <sup>(50)</sup>.

### **I.3.2. Fisiopatologia da Hipertensão Arterial**

#### **I.3.2.1. Fatores de risco da Hipertensão Arterial**

##### **1- Fatores de Risco Demográficos:**

##### **Idade, sexo e etnia:**

Os fatores demográficos como sejam a idade, sexo e etnia contribuem para a variação da pressão arterial.

##### **Idade:**

As alterações da pressão arterial ocorrem com o aumento da idade. A pressão arterial sistólica (PAS) aumenta ao longo de toda a vida. A pressão arterial diastólica (PAD), também aumenta predominante até aos 50 a 60 anos, após esta idade tende a estabilizar ou até a ter um decréscimo <sup>(1)</sup>.

A PAS é um melhor fator de previsão de eventos cardiovasculares do que a PAD após os 50 anos de idade. Nos indivíduos idosos a pressão de pulso (a diferença entre os valores da pressão arterial sistólica e diastólica), é um fator adicional de prognóstico de doença cardiovascular (DCV), além do que, os indivíduos com pressão sistólica isolada (PAS elevada e PAD normal ou baixa), também têm maior risco de DCV <sup>(51)</sup>.

##### **Sexo:**

Existe no sexo masculino maior percentagem de hipertensos do que no sexo feminino, pensa-se que é devido à proteção dos estrogénios no sexo feminino. Daí que na pós-menopausa, há aumento da prevalência de HTA nas mulheres, diminuindo assim a diferença na prevalência entre homens e mulheres <sup>(52)</sup>.

**Etnia:**

Mesmo dentro do mesmo país, a prevalência de hipertensão difere por etnia.

Segundo estudo realizado nos EUA a prevalência de HTA nos afro-americanos foi de 32,4%, nos caucasianos americanos de 23,3% e nos mexico-americanos de 22,6%. Pôss-se a hipótese de neste estudo haver um fator de confusão, o estatuto socioeconómico, indicador do estilo de vida e que está inversamente relacionado às taxas de prevalência, morbidade e mortalidade da hipertensão <sup>(53)</sup>.

**2- Consumo de sal:**

Em vários estudos epidemiológicos demonstrou-se uma correlação direta entre o consumo de sódio e a prevalência de HTA <sup>(54)</sup> e recentemente, em outros estudos, concluiu-se que maior ingestão de sódio também está associada a risco mais elevado de Acidente Vascular Cerebral (AVC) e de DCV <sup>(55)</sup>.

A evidência da associação do consumo de sódio com a hipertensão foi também demonstrada pelo *INTERSALT Group* <sup>(56)</sup>, ao serem estudadas as prevalências da Hipertensão arterial em populações com níveis de industrialização diferentes. Concluindo que populações ocidentais, com maior industrialização, tinham alto consumo de sal e maior prevalência de HTA comparadas com as populações rurais ou primitivas com baixo consumo de sal <sup>(56)</sup>.

**3- Diabetes, resistência à Insulina e HTA:**

A resistência à insulina per si, é considerado um fator de risco de doença cardiovascular <sup>(57)</sup>.

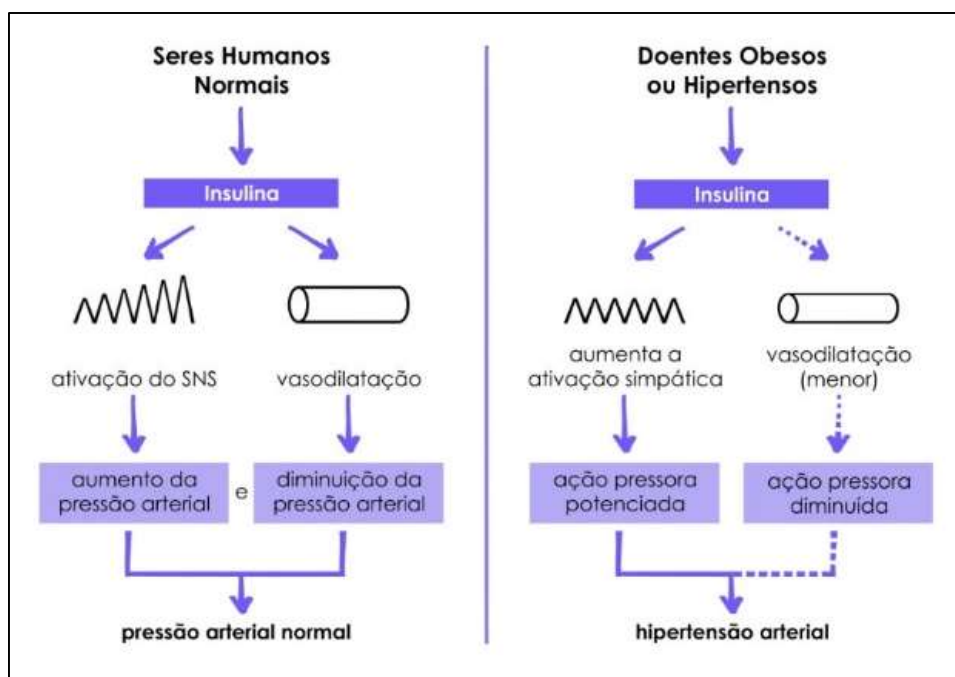
A associação entre HTA e a resistência à insulina está bem estabelecida. O mecanismo pelo qual a resistência à insulina e a hiperinsulinemia predispõem à HTA não está totalmente esclarecido.

O principal papel da insulina no organismo humano é o aumento da captação de glicose, principalmente, pela musculatura esquelética. Também sob o efeito da insulina há

maior vasodilatação, recrutamento de capilares, aumento de fluxo sanguíneo, havendo maior oferta de glicose e insulina ao músculo esquelético <sup>(58)</sup>.

Além destes citados, a insulina provoca aumento da reabsorção renal de sódio e água, alterações do transporte de eletrólitos através da membrana, resultando em hiperpolarização da musculatura vascular, aumento da atividade  $\text{Ca}^{++}$  - ATP ase, com maior acumulação de  $\text{Ca}^{++}$  intracelular e aumento da atividade simpática <sup>(23)</sup>.

Nos seres humanos normais a insulina aumenta a atividade simpática noradrenérgica do músculo esquelético. Isto é normalmente contrabalançado pelo efeito vasodilatador direto da insulina sobre a musculatura do vaso (que é maior do que o da atividade simpática noradrenérgica), dando como efeito final vasodilatação. Nos obesos e / ou hipertensos há um desequilíbrio, a insulina por um lado potencia a ativação simpática e por outro, atenua a vasodilatação, resultando finalmente no aumento da pressão arterial <sup>(23)</sup>.



**Figura 7 – Ação da Insulina em seres humanos normais, obesos ou hipertensos**  
(adaptado de Norman Kaplan, 2ª edição)

Isto evidencia-se pelo facto dos indivíduos resistentes à insulina, terem menor vasodilatação em resposta à infusão de insulina, do que os indivíduos normais <sup>(59)</sup>.



Sabe-se que a hiperinsulinemia aguda provoca diminuição na excreção de sódio, porém, isto não afeta a pressão arterial em indivíduos normotensos <sup>(60)</sup>.

A administração de insulina mesmo em doses farmacológicas, não causa elevação da pressão arterial <sup>(61)</sup>.

A hiperinsulinemia crônica exerce ação trófica na musculatura do vaso sanguíneo resultando num aumento da resistência vascular periférica e consequentemente aumento da pressão arterial <sup>(62)</sup>.

#### **4- Obesidade:**

A relação entre a HTA e a obesidade / índice de massa corporal (IMC) está bem caracterizada (53), existindo uma relação direta entre o IMC e a pressão arterial <sup>(63)</sup>.

Estudos transversais demonstram que obesidade está associada a níveis mais elevados de pressão arterial (PA) e que o ganho de peso, ao longo da vida, é um fator preditor importante de desenvolvimento de HTA <sup>(64)</sup>.

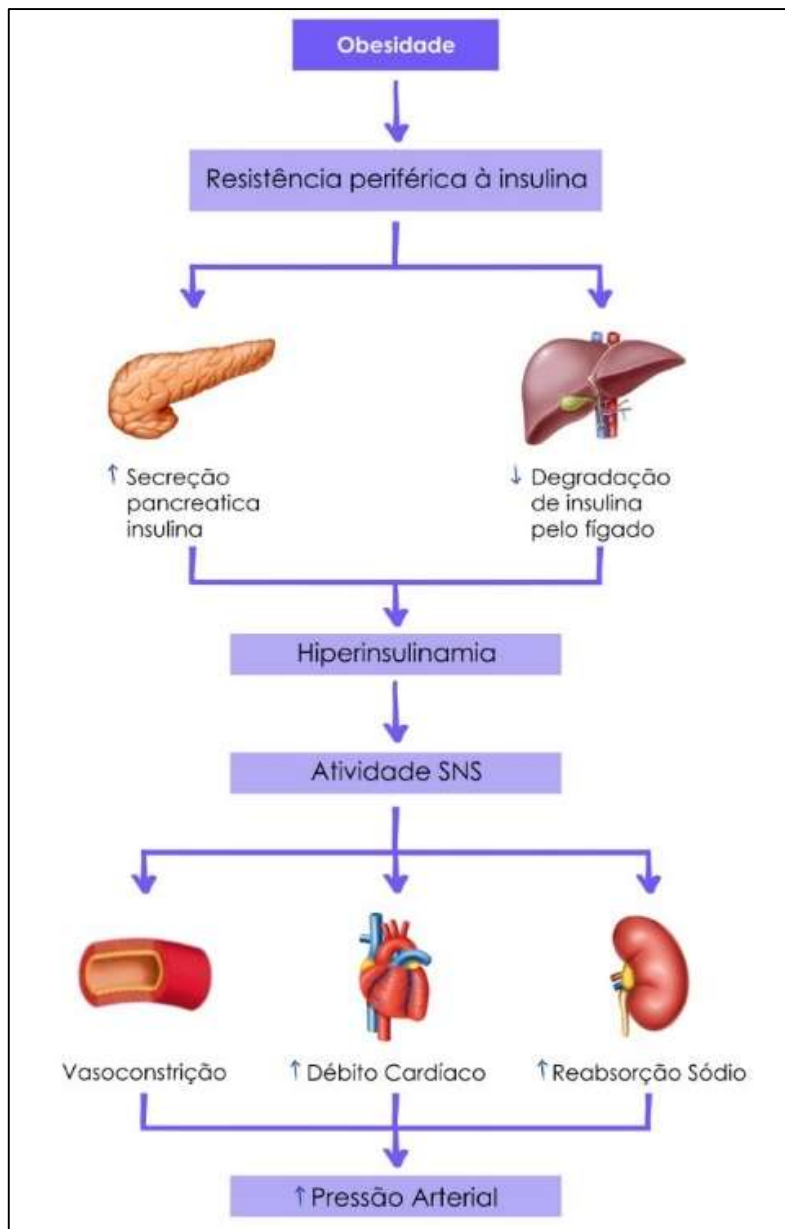


Figura 8 – Fisiopatologia da hipertensão associada à obesidade

#### Fisiopatologia da Hipertensão Arterial associada à Obesidade:

- Estimulação da atividade simpática

Nos obesos há uma atividade simpática aumentada, especialmente a nível renal e da musculatura lisa dos vasos, discutindo-se, no entanto se há aumento da atividade simpática cardíaca <sup>(65)</sup>.

A leptina é um peptídeo produzido no tecido adiposo. O aumento dos seus níveis plasmáticos está relacionado com um incremento da atividade simpática renal <sup>(66)</sup>.

Também já foi demonstrado a correlação da leptina plasmática com a pressão arterial média e com índice de massa corporal em adolescentes <sup>(67)</sup>

- **Ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona:**

Na obesidade há aumento da retenção renal de sódio, expansão do volume extracelular e aumento do fluxo sanguíneo, levando ao aumento do débito cardíaco. A obesidade está relacionada com o aumento da atividade da renina, aumento do angiotensinogénio, da enzima de conversão da angiotensina e da aldosterona. Isto evidencia-se com estudos realizados em modelos experimentais e em humanos obesos, em que o bloqueio crónico do recetor tipo 1 da angiotensina II ou da enzima de conversão da angiotensina, diminui a retenção de sódio e o aumento da pressão arterial <sup>(65)</sup>.

- **Aumento da reabsorção de sódio na obesidade**

Na obesidade há maior retenção de sódio e água pelo rim. Isto leva a um desvio da curva pressão-natriurese, de modo que os indivíduos obesos necessitam de uma pressão arterial, maior do que a normal, para manter o balanço entre a ingestão e excreção de sódio. Este aumento da reabsorção de sódio é compensado com o aumento da taxa de filtração glomerular. A obesidade está também associada ao desenvolvimento de proteinúria e perda gradual da função renal que condiciona a maior deslocamento da curva pressão-natriurese, levando conseqüentemente a maior elevação da pressão arterial <sup>(65)</sup>.

- **Aumento da resistência à insulina**

O aumento da atividade simpática nos obesos, está relacionado com a Hiperinsulinemia, isto poderá explicar o mecanismo fisiopatológico da resistência à insulina,

que é um dos achados importantes nos indivíduos obesos com fatores de risco cardiovascular (<sup>68</sup>).

- **Aumento da resistência vascular periférica**

A resistência vascular periférica é mais elevada nos obesos hipertensos quando comparada com os hipertensos não obesos (<sup>69</sup>).

## **5- Atividade física**

A atividade física tem efeito sobre a PA. Os pacientes com estilo de vida mais sedentária têm maior prevalência de hipertensão, independentemente da obesidade ou ingestão de sódio (<sup>70</sup>).

O exercício físico também melhora a resposta terapêutica anti-hipertensiva independente de modificações dietéticas ou da obesidade. A perda de peso e o exercício demonstraram aumentar a resposta ao fármaco anti-hipertensivo, porém desconhece-se se esta a melhoria na resposta se deve ao exercício físico ou à perda de peso (<sup>70</sup>).

## **6- Stress:**

O stress contribui para a elevação da pressão arterial, através da estimulação do sistema nervoso, leva a maior produção de adrenalina e consequentemente vasoconstrição e aumento da frequência cardíaca (<sup>53</sup>, <sup>71</sup>)

Isto pode ser amplamente comprovado na prática clínica com a «Hipertensão da bata branca» em que os indivíduos em ambiente de consultório, elevam a pressão arterial a valores superiores aos habituais (<sup>72</sup>).

Pensa-se que os indivíduos são hipertensos não só por serem submetidos a maior stress, mas também por responderem a este de maneira diferente. Comprovou-se que tanto em hipertensos como em normotensos com maior risco de ter HTA, têm maior reatividade cardiovascular e nervosa simpática (<sup>23</sup>).

Além do que, os hipertensos tendem a ficar mais emocionados e ansiosos durante mais tempo. A hipótese de uma predisposição genética poderá ser levantada, pelo fato dos filhos de pais hipertensos terem maior hiperreatividade ao stress. Os indivíduos expostos a stress psicológico podem apresentar hipertensão arterial mais frequentemente do que indivíduos similares submetidos a menor stress (<sup>23</sup>).

Também vários estudos têm enfatizado a associação entre stress laboral e o risco aumentado de doenças cardiovasculares e desenvolvimento progressivo da hipertensão arterial (<sup>73</sup>).

Havendo estudos que sugerem a implementação de um programa de gestão do stress no local de trabalho, o que poderá ser uma boa medida preventiva para a hipertensão arterial (<sup>74</sup>).

## **7- Tabaco:**

O tabaco tem vários constituintes, dentro deles, a nicotina age como um agonista adrenérgico, promovendo a libertação sistémica de catecolaminas e consequentemente ativação do sistema nervoso simpático, com aumento da frequência cardíaca e da pressão arterial (<sup>75, 76</sup>).

Após o uso agudo do tabaco, durante os primeiros 30 minutos, há um aumento da pressão arterial e da frequência cardíaca (<sup>75, 76</sup>).

No entanto sobre efeito dos hábitos tabágicos no aumento da pressão arterial, os resultados de alguns estudos levantaram controvérsia.

## **8- Álcool e Hipertensão Arterial:**

De acordo com diversos estudos publicados, existe uma relação entre o consumo de álcool e o aumento da pressão arterial, além do que a quantidade consumida relaciona-se de forma direta com a elevação da pressão arterial (<sup>77</sup>).

Isto é confirmado por estudos epidemiológicos transversais em que as sociedades onde há maior consumo de álcool, também apresentam maior prevalência de HTA (<sup>78</sup>).

Estima-se que o consumo de álcool contribui de 5-20% para a prevalência de hipertensão arterial na população (<sup>79</sup>).

Alguns estudos demonstram uma relação linear entre o consumo e a Hipertensão arterial, mas outros estudos, mostram esta relação, sob a forma de uma curva em J, em que indivíduos com baixo consumo, têm níveis de pressão arterial mais baixos do que os abstêmicos, mas à medida que o consumo de álcool aumenta, há também um grande aumento da PA (<sup>80</sup>).

Embora alguns estudos sugiram que em relação ao risco de HTA há diferenças em relação ao tipo de bebida alcoólica. Os indivíduos que bebem vinho têm menor risco de ter HTA em relação aos que bebem cerveja ou outras bebidas alcoólicas. Em outros estudos concluem que a relação entre o consumo de álcool e os níveis da PA, depende exclusivamente da quantidade de álcool ingerido (<sup>81</sup>).

### **Principais mecanismos de elevação da PA com o uso do álcool:**

O efeito imediato do consumo de álcool é a vasodilatação nos diversos leitos vasculares levando a discreta redução da pressão arterial. O uso continuado de álcool, eleva os níveis da pressão arterial pelos seguintes mecanismos:

- Alterações das membranas celulares que permitem maior entrada de cálcio (Ca++) intracelular da musculatura lisa.
- Estimulação da atividade nervosa simpática.
- Estimulação do Sistema Renina Angiotensina Aldosterona.
- Aumento da resistência à insulina e consequentemente hiperinsulinemia.

- Induz um desequilíbrio entre os vasoconstritores endógenos específico, como angiotensina II, endotelina-1 e nora-pinefrina e o óxido nítrico vasodilatador. (82, 83, 84)

Segundo as *Guidelines* europeias de HTA (2013) (51), os hipertensos não devem ultrapassar o consumo de álcool de 20 -30 gr/dia de álcool nos homens e de 10 a 20 gr/dia nas mulheres. O consumo total de etanol não deve exceder 140 gr /semana nos homens e 80 gr/semana nas mulheres (51).

## **I.4. Genética da Hipertensão**

### **I.4.1. Hipertensão monogénica**

#### **Formas mendelianas de HTA:**

Nos últimos anos, vários estudos, têm contribuído para elucidar as diferentes formas de hipertensão monogénica, os seus genes etiológicos, assim como os seus mecanismos moleculares, ajudando a compreender o contributo dos fatores genéticos na patogénese da hipertensão arterial essencial.

As formas de herança mendeliana de HTA, são formas monogénicas, raras, correspondendo a menos de 1% de todos os casos de HTA (85).

A suspeição desta etiologia faz-se, quando existe na genealogia um padrão de herança definida, dominante ou recessivo. Na generalidade, o quadro clínico nestas formas de herança mendeliana, trata-se de uma hipertensão arterial grave com início cedo, frequentemente na infância ou adolescência (86).

### **1- Hiperaldosteronismo familiar tipo I (HF- I):**

A aldosterona, o principal mineralocorticoide circulante, participa do volume sanguíneo e da homeostase do potássio sérico. O aldosteronismo primário é um distúrbio caracterizado por hipertensão arterial, podendo também nas formas mais graves, surgir hipocalcemia, por haver secreção autônoma de aldosterona da zona glomerular da glândula suprarrenal <sup>(87)</sup>.

O Hiperaldosteronismo familiar tipo I foi a primeira forma descrita de hiperaldosteronismo familiar. Esta síndrome foi também chamada «Aldosteronismo tratável com glicocorticóides» por ser uma síndrome que responde bem à terapêutica com Dexametasona. O seu fenótipo clínico que pode variar de hipertensão grave de início precoce a uma elevação ligeira da pressão arterial e hipocalcemia ligeira <sup>(88)</sup>.

Carateriza-se por retenção anormal de sal e água nos túbulos renais devido à hipersecreção moderada de aldosterona. Nestes doentes a secreção da aldosterona é regulada pela hormona adrenocorticotrófica (ACTH) e não pela Angiotensina II. Há supressão da atividade da renina plasmática <sup>(88)</sup>.

É uma doença autossômica dominante, causada por uma mutação no cromossoma humano 8 que contém os genes *CYP11B2* que codifica a aldosterona sintetase e o *CYP11B1* que codifica o esteroide 11 $\beta$ -hidroxilase. Durante a meiose pode formar-se por um «cross-over» de material genético entre o gene *CYP11B1* e o gene *CYP11B2* <sup>(87)</sup>.

Este gene híbrido resultante da fusão da região reguladora da 11 $\beta$ -hidroxilase com a o gene da aldosterona sintetase, leva a um aumento da expressão da hormona aldosterona sintetase, com consequente aumento dos níveis de aldosterona <sup>(87)</sup>. Esta vai produzir maior absorção de sódio e água no rim, aumento da volume circulante, conduzindo finalmente à hipertensão arterial <sup>(87)</sup>.

### **2- Hiperaldosteronismo familiar tipo II (HF-II):**

É causado por hiperplasia adrenocortical ou aldosteronoma ou ambos e é frequentemente transmitido de forma autossômica dominante. A sintomatologia é



idêntica ao Hiperaldosteronismo familiar tipo I, mas não responde ao tratamento com dexametasona. Não se conhece bem qual o gene que o causa, mas vários estudos indicam que está localizado no braço curto do cromossoma 7 região 7p22 <sup>(89)</sup>.

Uma grande família com esta síndrome foi estudada e seus membros foram avaliados, medindo a razão entre a aldosterona e a renina. Naqueles com uma razão aumentada, confirmou-se o HF-II pelo teste de supressão de fludrocortisona. Ao estudar todo o genoma, a ligação genética foi identificada nos marcadores polimórficos D7S511, D7S517 e GATA24F03 no cromossoma 7, uma região que corresponde à banda citogenética 7p22. Este é o primeiro locus identificado para o Hiperaldosteronismo familiar tipo II <sup>(89, 87)</sup>.

### **3- Síndrome de Liddle**

É uma síndrome autossômica dominante, causada por mutações dos genes que codificam a subunidade beta ou gama do canal epitelial de sódio (*SCNN1B* e *SCNN1G*, respetivamente), ambos localizados no cromossoma 16p13-12. Estas mutações resultam na eliminação dos últimos 45-76 aminoácidos normais do C terminal das subunidades beta ou gama que estão adjacentes ao braço curto do cromossomo 16 <sup>(90, 91)</sup>.

Nesta síndrome há desregulação do canal epitelial de sódio a nível do nefrónio, com aumento da reabsorção de sódio e consequente hipertensão arterial que pode ser moderada a grave. Há hipocaliemia por maior excreção de potássio, alcalose metabólica e expansão do plasma. Os níveis séricos de renina e aldosterona encontram-se suprimidos <sup>(88)</sup>.

Esta síndrome, chamada também pseudoaldosteronismo, por ter sintomas semelhantes à Síndrome de excesso de mineralocorticóides, mas porém, não tem resposta eficaz à terapia com dexametasona <sup>(86)</sup>.

Na Síndrome de Liddle a pressão arterial elevada responde especificamente ao amiloride <sup>(88)</sup>.

O aumento da atividade do canal não é explicado pela alteração individual do canal epitelial de sódio mas sim por um aumento dos números de canais ativos da membrana celular (88).

A ubiquitina-proteína ligase Nedd4 liga-se ao C terminal do canal epitelial de sódio e inativa-o. Quando há mutações dos genes que codificam a subunidade beta ou gama deste canal, em que há deleção ou alteração do C terminal, a ubiquitina-proteína ligase Nedd4, não atua e não há inibição da atividade do canal (88).

#### **4- Síndrome de excesso aparente de mineralocorticóides**

É uma forma autossômica recessiva de hipertensão monogénica que resulta de concentrações elevadas de cortisol no rim. A enzima 11 $\beta$ -hidroxi-esteróide desidrogenase tipo 2 (11 $\beta$ -HSD2) é co-expressa com o recetor mineralocorticóide nos rins, convertendo o cortisol em cortisona, o seu metabolito inativo.

A aldosterona faz parte do SRAA, a nível do rim liga-se aos recetores mineralocorticóides, levando ao aumento de volume e consequentemente da pressão arterial. O cortisol também tem afinidade para estes recetores mineralocorticóides. Quando há uma deficiência desta enzima 11 $\beta$ -HSD2, o cortisol não é metabolizado, ligando-se aos recetores mineralocorticóides levando a retenção de sódio, hipocalémia, alcalose e hipertensão. Nesta síndrome há supressão do SRAA, com hipoaldosteronismo e baixa de renina.

O gene HSD11B2 que codifica a enzima 11 $\beta$ -HSD2 está no cromossoma 16q22. Estão descritas mais de 30 mutações diferentes em aproximadamente 60 famílias afetadas (92).

#### **5- Síndrome do recetor mineralocorticóide**

As mutações no gene do recetor mineralocorticóide causam pseudo-hipoaldosteronismo tipo 1 e hipertensão arterial.

O recetor mineralocorticoide (RM), também chamado recetor da aldosterona, é um recetor nuclear da subfamília 3, grupo C, membro 2 (NR3C2), de grande afinidade para os mineralocorticóides. Nos seres humanos é codificado pelo gene NR3C2 que está localizado no cromossomo 4q 31.2. O recetor mineralocorticoide tem igual afinidade para os mineralocorticóides e para os glucocorticoides. <sup>(93)</sup>

Uma mutação que resulta da substituição de uma leucina por serina, no codão 810 no gene do RM, é responsável por uma síndrome de hipertensão monogénica. Clinicamente caracteriza-se por uma hipertensão de início precoce, com exacerbações graves durante a gravidez e com complicações de parto prematuro <sup>(94)</sup>.

Os esteroides incluindo a progesterona, têm propriedades antagonistas quando ligadas ao recetor mineralocorticoide (MR) de tipo selvagem, mas são capazes de ativar o recetor MR mutante, resultando num efeito semelhante à aldosterona. Isto justifica o agravamento da hipertensão nas portadoras desta mutação durante a gravidez <sup>(94)</sup>.

As pessoas afetadas têm baixa atividade de renina plasmática e baixas concentrações de aldosterona <sup>(94)</sup>.

Nienke van Leeuwen et al 2010, descobriram uma variante genética do recetor mineralocorticoide C.-2G > C (rs2070951). Os indivíduos com genótipo GG apresentam valores de renina plasmática significativamente mais elevados e associa-se também com níveis plasmáticos mais elevados de aldosterona. O alelo G do polimorfismo genético C.-2G > C no gene RM, associa-se ao aumento da ativação do eixo renina-angiotensina-aldosterona e consequentemente com o aumento da pressão arterial, sendo provavelmente devido à diminuição da expressão do recetor mineralocorticoide <sup>(95)</sup>.

## **6- Síndrome de Gordon**

A síndrome de Gordon também chamada pseudo-hipoaldosteronismo tipo II, é uma doença que cursa com Hipertensão arterial, hipercaliemia com filtração glomerular renal normal, que é corrigida pela terapêutica com diuréticos tiazídicos.

A análise das famílias com Síndrome de Gordon mostra que é uma doença de transmissão autossômica. O fenótipo hipertensivo é ligeiro, levando a que muitas vezes seja uma doença sub-diagnosticada (<sup>88</sup>).

As WNKs (with-no-lysine K) são uma família de proteínas quinases serina-treonina. As mutações das proteínas quinases WNK1 e WNK4 causam a Síndrome de Gordon. Estas quinases WNK desempenham um papel importante na regulação do transporte de sódio e potássio a nível do rim, que na presença da mutação ficam desregulados. Há maior reabsorção de sódio que levam a retenção de água e aumento da pressão arterial (<sup>96, 97</sup>).

## **7- Hipertensão autossômica dominante com braquidactilia**

Foi descrito pela 1ª vez numa família turca. Uma síndrome semelhante foi descrita numa família no Canadá e noutra nos EUA (<sup>88</sup>).

Os membros da família afetados têm braquidactilia, estatura baixa estatura e hipertensão grave de início na infância (<sup>98</sup>).

É uma doença herdada de forma autossômica dominante e a mutação está no cromossoma 12p2, no entanto não se conhece bem qual o mecanismo fisiopatológico. Foram excluídos com causa desta doença vários mecanismos, incluindo a sensibilidade ao sal, desregulação da renina, angiotensina, aldosterona ou das catecolaminas (<sup>98</sup>).

Maass et al. (2015) identificou em seis famílias com Hipertensão mendeliana e braquidactilia, seis mutações na fosfodiesterase 3A (PDE3A) e sugeriu que estas mutações causam hipertensão independente do sal, mas dependente da idade. Há desregulação dos barorreceptores e aumento da taxa de crescimento dos fibroblastos, contribuindo esta para a hiperplasia da parede vascular e aumento da resistência vascular periférica (<sup>99</sup>).

## **I.4.2. Hipertensão Arterial Essencial**

### **I.4.2.1. Estratégias para estudo genético da Hipertensão**

#### **Estratégias para estudo genético da Hipertensão Arterial Essencial:**

Com o avanço tecnológico na identificação e genotipagem de marcadores polimórficos de DNA, permitiu a identificação de SNPs (*single nucleotide polymorphisms*), que hoje em dia são frequentemente utilizados. Segundo o (*International HapMap Consortium, 2007*) <sup>(100)</sup>, existem mais de 3 milhões de SNPs no genoma humano.

Para o estudo genético das doenças complexas e multifatoriais utiliza-se basicamente duas metodologias, os estudos de ligação e de associação <sup>(100)</sup>.

#### **I.4.2.1.1. Estudos de ligação Génica**

Os estudos de ligação fundamentam-se no conceito de «ligação génica», que é a presença de alelos em dois *locus* diferentes, com localização próxima, numa mesma região cromossómica, que não sofrem recombinação entre si e são transmitidos na meiose conjuntamente. Estes permitem o estudo do genoma de uma forma indireta. Os estudos de ligação podem ser baseados em marcadores polimórficos que ocorrem em sequências de DNA codificadoras ou em sequências de DNA não codificadoras, que não têm qualquer efeito no fenótipo <sup>(101)</sup>.

Os polimorfismos localizados nas regiões codificadoras, podem ser detetados pelo estudo do polimorfismo das proteínas <sup>(101)</sup>.

São usados para estudar a co-segregação de marcadores genéticos com o fenótipo (ex: HTA) em famílias com múltiplos membros afetados <sup>(102)</sup>.

Nos últimos anos os estudos de ligação genómica em larga escala – os *genomewide linkage studies*, têm sido utilizados para a deteção de genes reguladores da pressão arterial e com suscetibilidade para a hipertensão arterial. Através destes pode-se estudar a co-segregação de marcadores genéticos distribuídos por todo o genoma tais como os *Short tandem repetitive - SRTs* e os *Single nucleotide polymorphisms- SNPs* com a HTA (<sup>103</sup>).

O *Lod Score* é a análise estatística utilizada para avaliar se os resultados de um estudo de ligação são significativos, comprovando ou não a ligação entre o marcador e a doença. O *Lod Score* (é um logaritmo com base em 10 das probabilidades, se maior que 3 evidencia ligação à patologia) (<sup>103</sup>).

Uma das principais vantagens destes estudos é o facto de se poder analisar nos membros das famílias afetados, variantes comuns no genoma completo, permitindo identificar em todo o genoma diferentes *Locis* envolvidos na HTA.

No entanto estes estudos de ligação têm limitações, têm baixo poder estatístico, dada a dificuldade em obter um grande número de famílias e com vários membros afetados com HTA. Além do que a HTA é uma doença multifatorial e poligénica, com múltiplos genes suscetíveis, mas com baixa penetração. Por esta razão, os estudos de ligação génica, não têm tido grande êxito para definir quais os genes envolvidos na fisiopatologia da HTA (<sup>103</sup>).

#### **I.4.2.1.2. Estudos de Associação**

Estudos de associação genética são realizados num contexto caso-controlo, a fim de identificar as variantes genéticas associadas a um determinado fenótipo. Diferenças significativas nas frequências alélicas ou genotípicas entre casos (indivíduos afetados) e controlos (indivíduos não afetados), são tidas como evidências para a associação destes fatores à característica fenotípica sob estudo.

É uma abordagem de natureza indireta, que consiste na detecção de um marcador associado a elevado risco para a doença em estudo, mas que não é o responsável da doença.

Os Estudos de Associação dividem-se em dois tipos:

- 1) Os estudos de casos e controlos – Indivíduos doentes não relacionados parentalmente, comparados com controlos sãos que também não são relacionados parentalmente.
- 2) Estudos em famílias, mais especificamente estudam-se 3 elementos, os progenitores e o indivíduo doente.

O objetivo dos estudos de associação é comparar a incidência de um polimorfismo marcador (ex: SNP) na população de indivíduos afetados por uma doença, com a incidência do mesmo marcador na população controlo e testar se existe diferença significativa entre os grupos. Se a variante é mais comum nos casos do que nos controlos e com significância estatística, dizemos que a variante está associada à suscetibilidade da doença. Se a variável é mais frequente nos controlos do que nos casos e com significância estatística, dizemos que confere proteção <sup>(103)</sup>.

No caso dos estudos de associação baseados em famílias usa-se o método denominado *Teste de Desequilíbrio de Transmissão*, para comparar a frequência com que os pais heterozigotos, transmitem um alelo específico de um marcador genético (ex SNP) a um filho afetado <sup>(103)</sup>.

Os estudos de Associação têm vantagem em relação aos estudos de ligação pois podem ser realizados em grupos de indivíduos sem parentesco, sejam casos ou controlos, tornando-se mais fácil o recrutamento dos indivíduos para o estudo. Os estudos de associação são adequados para detetar efeitos genéticos moderados ou pequenos de variantes frequentes, em contraste com os estudos de ligação, que são mais adequados para detetar grandes efeitos de variantes raras <sup>(104)</sup>.

Nas últimas décadas têm sido descritos na literatura vários estudos de associação de genes candidatos com a hipertensão arterial. Associações significativas são encontradas entre polimorfismos variados em diversas populações, mas seus resultados são controversos.

É importante referir a falta de reprodutibilidade dos resultados destes estudos nas várias populações, deve-se a diversos fatores de "confusão", como sejam amostras pequenas, estratificação populacional, origem étnica, a interação entre fatores ambientais e genéticos, efeito modesto das variantes gênicas no fenótipo e presença de interações gênicas (epistasia) <sup>(105)</sup>.

A Hipertensão arterial é uma doença complexa e mesmo quando se alcança um poder estatístico adequado para se detetar associações entre genes e a doença, muitas vezes os fatores de confusão dificultam a interpretação dos estudos de associação.

#### **I.4.2.1.3. Genome-wide Associations Studies- GWAS na HTA**

Os estudos de Associação do Genoma Completo (GWAS) utilizam plataformas que analisam simultaneamente centenas de milhares de marcadores genéticos de todo o genoma, em diferentes indivíduos, com a finalidade de procurar novos locus que contêm genes de suscetibilidade a diversas doenças complexas, incluindo a HTA.

Os primeiros estudos GWAS foram realizados em 2007 pelo *The Framingham Heart Study (FHS)* e pelo *Wellcome Trust Case Control Consortium (WTCCC)*, mas com poucos resultados foram evidenciados em relação à HTA.

O estudo *WTCCC*, analisou 14.000 casos com sete doenças comuns e 3.000 controles. Foram identificadas vinte e quatro associações independentes, nas sete doenças estudadas. Nestas, apenas a hipertensão não foi associada a nenhum marcador genético, com significância estatística (com nível de significância do genoma de  $5 \times 10^{-7}$ ). O marcador mais fortemente associado à HTA (próximo do gene *CHRM3*) teve significância de  $7,7 \times 10^{-7}$  <sup>(106)</sup>.



Em 2009, dois estudos de associação genômica (GWAS), cada um com >25.000 indivíduos de ascendência europeia, identificaram 13 *loci* associados à PAS, PAD e Hipertensão Arterial (<sup>107, 108</sup>).

Um outro estudo feito numa população afro-americana, evidenciou associações entre vários genes e a pressão arterial sistólica (<sup>109</sup>).

Em 2011 são relatados pelo Consórcio Internacional de Pressão Arterial (ICBP), um estudo com mais de 200 mil indivíduos de ascendência europeia, que identificou dezasseis *loci* relacionados com a pressão arterial. Um *score* de risco genético baseado em 29 variantes significativas do genoma, foi associado à hipertensão arterial, assim como à espessura da parede ventricular esquerda, acidente vascular cerebral e doença arterial coronária, não se relacionando porém, com a insuficiência renal (<sup>110</sup>).

Tragante V. et al (<sup>111</sup>), em 2014, genotiparam em 87,736 indivíduos de ascendência europeia mais de 50.000 SNPs, realizaram uma meta-análise e posteriormente replicaram os achados num conjunto de 68.368 indivíduos de ascendência europeia. Confirmaram em 31 genes associação com HTA, destes, 27 tinham já sido relatados anteriormente, mas 11 novos *locis* foram revelados como tendo papel importante na pressão arterial.

Recentemente em 2017, foi estudado em 152.249 indivíduos de ascendência europeia, participantes do Biobank do Reino Unido, a pressão arterial (sistólica, diastólica), com replicação independente em outras coortes. No total, foram incluídos dados GWAS de 330,956 indivíduos e SNVs exônicos de 422,604 indivíduos. Foram validados 107 *loci* com associação significativa para a pressão arterial. Destes 32 *loci* não tinham sido anteriormente relatados e 53 foram validados pela 1ª vez (<sup>112</sup>).

Com os estudos GWAS, milhares de marcadores genéticos são testados para encontrar alguns verdadeiramente associados à pressão arterial. No entanto, os estudos GWAS podem ser um método altamente útil, na identificação de genes potencialmente associados à suscetibilidade de HTA. Salienta-se a importância destes estudos, para uma investigação mais aprofundada, no sentido de desvendar e compreender a arquitetura genética da pressão arterial.

## **I.5. Genes Candidatos selecionados para estudo**

### **I.5.1. Polimorfismos associados ao eixo Renina-Angiotensina-Aldosterona**

- **Angiotensin-converting enzyme (ACE Ins/Del) rs4340**
- *Angiotensin-converting enzyme (ACE G2350A) rs4343*
- *Angiotensinogen (AGT T174M) rs4762*
- *Angiotensinogen (AGT M235T) rs699*
- *Angiotensin II type 1 receptor (AGTR1 A1166C) rs5186*
- *Aldosterone synthase (CYP11B2 C-344T) rs1799998*

### **I.5.2. Polimorfismos que interferem no balanço de sal e água**

- *Alpha-Adducin 1 ADD1 (G460W) rs4961*
- *Sodium Channel Epithelial 1 Gamma subunit (SCNN1G G-173A) rs5718*

### **I.5.3. Polimorfismos do Sistema Simpático Adrenérgico**

- *Adrenergic Receptor Beta 1 (ADRB1 R389G) rs1801253*
- *Adrenergic Receptor Beta 2 (ADRB2 R16G) rs1042713*

### **I.5.4. Polimorfismos que atuam a nível celular**

- *G Protein subunit Beta 3 (GNB3 C825T) rs5443*
- *ATPase Plasma membrane calcium-transporting 1 (ATP2B1 C/T) rs2681472*
- *Cytochrome P450 Family 17 Subfamily A Member 1 (CYP17A1 C/T) rs11191548*
- *Solute Carrier Family 30 Member 2 (SLC4A2 C/T) rs2303934*

| Gene           | Nome  | Polimorfismo          | SNP ID     | Cr | Posição   |
|----------------|---|-----------------------|------------|----|-----------|
| <b>ACE</b>     | <i>Angiotensin-converting enzyme</i>                  | <b>ACE I/D</b>        | rs4340     | 17 | 61565892  |
| <b>ACE</b>     | <i>Angiotensin-converting enzyme</i>                  | <b>ACE A2350G</b>     | rs4343     | 17 | 63488670  |
| <b>AGT</b>     | <i>Angiotensinogen</i>                                | <b>AGT T174M</b>      | rs4762     | 1  | 230710231 |
| <b>AGT</b>     | <i>Angiotensinogen</i>                                | <b>AGT M235T</b>      | rs699      | 1  | 230710048 |
| <b>AGTR1</b>   | <i>Angiotensin II type 1 receptor</i>                 | <b>AGTR1 A1166C</b>   | rs5186     | 3  | 148742201 |
| <b>CYP11B2</b> | <i>Aldosterone synthase</i>                           | <b>CYP11B2 C-344T</b> | rs1799998  | 8  | 142918184 |
| <b>ADD1</b>    | <i>Alpha-Adducin 1</i>                                | <b>ADD1 G460W</b>     | rs4961     | 4  | 2904980   |
| <b>SCNN1G</b>  | <i>Sodium Channel Epithelial 1 Gamma subunit</i>      | <b>SCNN1G G-173A</b>  | rs5718     | 16 | 23182544  |
| <b>GNβ3</b>    | <i>G Protein subunit Beta 3</i>                       | <b>GNβ3 C825T</b>     | rs5443     | 12 | 6845711   |
| <b>ADRβ1</b>   | <i>Adrenergic Receptor Beta 1</i>                     | <b>ADRβ1 G389R</b>    | rs1801253  | 10 | 114045297 |
| <b>ADRβ2</b>   | <i>Adrenergic Receptor Beta 2</i>                     | <b>ADRβ2 R16G</b>     | rs1042713  | 5  | 148826877 |
| <b>ATP2B1</b>  | <i>ATPase Plasma membrane calcium-transporting 1</i>  | <b>ATP2B1 A/G</b>     | rs2681472  | 12 | 89615182  |
| <b>CYP17A1</b> | <i>Cytochrome P450 Family 17 Subfamily A Member 1</i> | <b>CYP17A1 T/C</b>    | rs11191548 | 10 | 103086421 |
| <b>SLC4A2</b>  | <i>Solute Carrier Family 30 Member 2</i>              | <b>SLC4A2 C/T</b>     | rs2303934  | 7  | 150767540 |

Polimorfismos associados ao eixo Renina-Angiotensina-Aldosterona:

- **Angiotensin-converting enzyme (*ACE Ins/Del*) rs4340**

O gene *ACE I/D* humano localiza-se no cromossoma 17q23 é um polimorfismo de inserção/deleção (I/D) de 287 pb no intrão 16 e foi identificado e utilizado extensivamente como um marcador genético <sup>(113)</sup>.

A enzima conversora da angiotensina (ECA) tem um papel chave na geração da angiotensina II e degradação da bradicinina e através destas, afeta a morfologia e a reatividade da parede vascular, assim como a função renal. O polimorfismo do gene *ACE I/D* modula fortemente o nível de ECA plasmática <sup>(114)</sup>, sendo que cerca de metade dessa variabilidade é explicada por este polimorfismo <sup>(115)</sup>.

Alguns estudos descreveram o alelo D como fator de risco para hipertensão arterial em várias populações <sup>(116, 117)</sup>.

Em meta-análise Ji D.L. Zang et al. (...) reportou que o genótipo DD do polimorfismo *ECA I/D* associou-se com HTA com (odds ratio 1,61) e sob modelos genéticos dominantes, recessivos e aditivos, também foram encontradas associações positivas <sup>(118)</sup>.

No entanto noutros estudos esta associação não se comprovou <sup>(119, 120, 121)</sup>.

- **Angiotensin-converting enzyme (*ACE G2350A*) rs4343**

Um outro polimorfismo do gene *ACE*, uma transição A/G na base 2350 do exão 17, A2350G (*ACE-8*), foi estudado por Zhu et al. <sup>(122)</sup> numa amostra populacional da Nigéria com 1343 indivíduos e associou-o a maior concentração de ECA plasmática e com a pressão sanguínea <sup>(122)</sup>.

Saeed Mahmood et al. <sup>(123)</sup> conclui que o genótipo *ACE G/G 2350* está associado com o aparecimento de HTA (OR=1,06 - 3,07, p=0,02) (38), mas noutros estudos os resultados foram inconclusivos <sup>(124)</sup>.

Numa meta-análise com 1699 casos e 1274 controles, W. Niu et al (40), comparou o alelo 2350G com o alelo 2350A, concluindo que este conferiu um efeito protetor em relação à hipertensão (OR=0,81, IC 95% 0,56 - 1,18; p=0,28). Também concluiu que o alelo ACE 2350A, confere uma redução significativa do risco de hipertensão nos muçulmanos do Golfo Árabe e do Paquistão e um risco elevado de HTA na população Chinesa Han (<sup>125</sup>).

- **Angiotensinogen (AGT T174M) rs4762**

O polimorfismo (AGT T174M) rs4762 está localizado no exão 2 em que há uma troca de treonina por metionina na posição 174.

Jeunemaitre X et al (1992) (<sup>126</sup>) também o estudou mas concluiu que este polimorfismo não se associava à HTA, nem com o nível circulante de angiotensina II.

No entanto Mohana VU et al., em estudo caso-controlo, comprova a associação deste polimorfismo com HTA. O alelo 174M é mais prevalente nas mulheres hipertensas do que nos controlos (0,20 vs. 0,12; P = 0,059), associando-se ao aparecimento de HTA principalmente nas mulheres (<sup>127</sup>).

Em outros estudos comprovou-se a associação do AGT M235T rs699 e do AGT T174M rs4762 no desenvolvimento de HTA (<sup>128</sup>).

- **Angiotensinogen (AGT M235T) rs699**

O gene do Angiotensinogénio (AGT) tem 5 exões e 4 interões com uma extensão de 13 Kb e está localizado no braço longo do cromossoma 1, na posição 42-3 (1q42-3)

Vários polimorfismos foram identificados neste gene.

O polimorfismo (AGT M235T) rs699 está localizado no exão 2 posição 704 onde a citosina substitui a timidina, levando a uma troca de metionina por treonina na posição 235.

Jeunemaitre X et al (1992) <sup>(126)</sup> estudaram o papel de 15 polimorfismos do gene do angiotensinogénio e o aparecimento de HTA.

Concluindo que o polimorfismo (AGT M235T) rs699 se associava à HTA. O alelo T deste polimorfismo associava-se a maior nível circulante de angiotensina II, o que justificaria o seu papel no desenvolvimento da HTA.

Posteriormente outros estudos foram feitos que associaram este polimorfismo à HTA, mas outros no entanto tiraram resultados inconcidentes.

Outras meta-análises demonstraram uma significativa associação entre o polimorfismo AGT M235T e a HTA e que o alelo 235T confere maior risco de HTA <sup>(129, 130, 131)</sup>.

- **Angiotensin II type 1 receptor (*AGTR1* A1166C) rs5186**

A angiotensina II estimula o recetor da angiotensina II (AGTR1), desencadeando uma resposta hipertensiva à custa da vasoconstrição e de expansão de volume.

O gene do recetor AGTR1 está localizado no braço longo do cromossomo 3, tem um comprimento cerca de 55 kb e contém 5 exões e 4 intrões. A região codificadora está localizada no quinto exão, enquanto os quatro primeiros exões codificam sequências 5'-não traduzidas. O polimorfismo do recetor tipo I da Angiotensina II (*AGTR1* A1166C) rs5186, está localizado na região não-codificadora 3', onde ocorre uma substituição do nucleotídeo adenina por citosina, na posição 1166.

Bonnardeaux et al <sup>(132)</sup> fizeram um estudo caso-controle com o objetivo de estudar a associação deste polimorfismo com a HTA. Dos cinco polimorfismos por eles descritos, somente o polimorfismo AGTR1 A1166C se associava a HTA. Esta associação foi mais marcada nos hipertensos de início precoce e na hipertensão mais severa. Outros estudos caso-controlo subsequentes, confirmaram esta mesma associação <sup>(133, 134)</sup>, noutros no entanto tal não se verificou <sup>(135)</sup>.

Também Wang et al. <sup>(133)</sup> concluiu que a frequência do alelo C e do genótipo CC em 108 pacientes caucasianos hipertensos com história familiar de HTA, foram significativamente mais elevadas do que em 84 controles normotensos <sup>(133)</sup>.

Amant C, et al (1997), estudou em indivíduos com artérias coronárias normais a resposta à injeção de maleato de metilergonovina e concluiu que os homozigotos CC tinham maior vasoconstrição das artérias coronárias distais após a metilergonovina do que os indivíduos AA (<sup>136</sup>).

Outro estudo também associa o alelo C do AGTR1 A1166C a vasoreatividade aumentada à angiotensina II nas artérias humanas (<sup>137</sup>).

Este aumento da vasoconstrição associada ao polimorfismo A1166C, pode explicar o aumento da pressão arterial nos indivíduos portadores do alelo C.

- **Aldosterone synthase (CYP11B2 C-344T) rs1799998**

O gene da aldosterona sintetase (CYP11B2), está localizado no cromossoma 8q21 e codifica a esteróide 18-hidroxilase, é surpreendentemente diferente da CYP11B1, embora as sequências dos seus exões são 93% idênticos. O gene CYP11B2, desempenha um papel importante na biossíntese da aldosterona e expressa-se na a nível da glândula suprarrenal, tanto na região fasciculata como na glomerulosa (<sup>138</sup>).

Um polimorfismo na região flanqueadora 5 'do CYP11B2, T (-344) C, foi relatado como associado à hipertensão arterial e níveis plasmáticos mais elevados de aldosterona, numa população de caucasianos (<sup>139</sup>).

Polimorfismos que interferem no balanço de sal e água:

- **Alpha-Adducin 1 *ADD1* (G460W) rs4961**

A aducina é uma proteína heterodimérica do citoesqueleto que está implicada na regulação da transdução de sinal celular e no transporte de iões através da membrana citoplasmática, modulando a expressão superficial de múltiplos transportadores e bombas, como a bomba Na-K ATPase.

A sua implicação na regulação do transporte renal de Na<sup>+</sup> sugere que as suas variantes genéticas podem contribuir para a HTA.

A adducina é composta por duas subunidades (subunidade  $\alpha$  (103 KD) e  $\beta$  (97KD) ou  $\gamma$ -subunidade (90KD)) que são codificados por três genes (*ADD1*, *ADD2* e *ADD3*, respetivamente) e estão localizados em diferentes cromossomas (<sup>140</sup>).

A nível do gene da Alfa aducina 1 (*ADD1*), no exão 10 no cromossoma 4p16.3, encontra-se o polimorfismo de nucleótido único (SNP rs4961), em que uma transversão da guanina por timina no nucleótido 614, leva a uma substituição da glicina (G) pelo triptofano (W) na posição 460 do aminoácido (<sup>141</sup>).

Esta variante genética *ADD1* 460 W modula a capacidade global das células epiteliais tubulares para transportar iões, levando maior atividade da bomba Na-KATPase e consequentemente ao aumento da reabsorção de sódio a nível do túbulo renal proximal (<sup>142</sup>).

Cusi et al. (<sup>234</sup>) descreveu que a variante genética (460 W) está associada ao desenvolvimento de HTA. (<sup>234</sup>, <sup>143</sup>).

Também outros investigadores confirmaram a associação desta variante genética com a HTA, (<sup>143</sup>, <sup>144</sup>, <sup>145</sup>, <sup>146</sup>, <sup>147</sup>) mas em outros estudos tal não sucedeu (<sup>148</sup>, <sup>149</sup>, <sup>150</sup>, <sup>151</sup>).



- **Sodium Channel Epithelial 1 Gamma subunit (*SCNN1G* G-173A) rs5718**

O canal epitelial de sódio é constituído por 3 sub-unidades  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  que estão ao redor do canal se movimentam os iões de sódio. Cada sub-unidade possui terminias amino ( $\text{NH}_2$ ) e carboxílicos ( $\text{COOH}$ ) que estão na superfície extra-celular da membrana e duas helices transmembranares M1 e M2.

Várias mutações dos genes que codificam as sub-unidades  $\beta$  e  $\gamma$ , levam a deleções do COOH-terminal ou substituições dos aminoácidos ricos em prolina do COOH-terminal (<sup>90, 152</sup>).

O gene *SCNN1G* localizado no cromossoma humano 16p12 codifica a  $\gamma$  - subunidade do canal epitelial de sódio sensível ao amiloride e as suas mutações podem levar ao Síndrome de Liddle ou ao pseudo-hipoaldosteronismo tipo I. (<sup>91, 153</sup>)

Pensa-se que as mutações das sub-unidades  $\beta$  e  $\gamma$  responsáveis pelo Síndrome de Liddle agravam a remoção de canais activos das membranas celulares apicais (<sup>189</sup>) resultando em excessiva reabsorção renal de sódio e de água e em última instância em hipertensão.

Estas mutações mantêm a entrada do canal aberta e, portanto, aumentam a corrente de sódio (<sup>189, 152</sup>).

Wong et al. 1999 (<sup>154</sup>) encontraram associação significativa entre PAS e o gene *SCNN1G*.

Iwai N et al. (<sup>155</sup>) observaram que o polimorfismo G (-173) A de *SCNN1G* rs5718, teve um efeito significativo sobre a pressão sistólica ( $P=0.0050$ ) e a pressão de pulso ( $P=0.0050$ ). O genótipo AA foi associado a queda de 11 mmHg na pressão sistólica e a queda de 8 mmHg na pressão de pulso e com maior prevalência de hipotensão ( $P=0.0195$ ).

Vários estudos relatam resultados inconsistentes e contraditórios sobre o papel do gene *SCNN1G* na hipertensão arterial (<sup>156, 157</sup>).

- **Adrenergic Receptor Beta 1 (*ADRB1* R389G) rs1801253**

O receptor Beta1- adrenérgico (*ADRB1*) tem um papel fundamental na mediação da transdução de sinal do sistema simpático-adrenérgico e está envolvido na regulação do débito cardíaco e da resistência vascular periférica.

O gene do recetor adrenergico Beta1 está localizado no cromossoma 10q24-26. Quarenta e cinco polimorfismos foram identificados neste gene e 13 destes resultados em mudanças nos aminoácidos da proteína do B1 adrenorecetor. O polimorfismo *ADRB1* R389G rs1801253 resulta de uma substituição de Arginina (R) por Glicina (G) na posição 389.

Pen Y. et al. estudou em duas populações independentes o gene do recetor adrenergico  $\beta$ 1 R389G (*ADR*  $\beta$ 1 R389G) e concluiu que o genótipo R389R do gene *ADR*  $\beta$ 1 estava associado a maior risco de hipertensão arterial (OR 1,77, IC 95% (IC) 1,09-2,98;  $p = 0,008$ ) na primeira população estudada sendo isso replicado numa segunda população com (OR 1,65, IC 95% 1,07-2,89,  $p=0,01$ ). Concluiu também, que os indivíduos com o genótipo R389R tiveram uma pressão arterial diastólica mais elevada (100,29 +/- 11,01 mm Hg) do que os com os genótipos R389G e G389G (95,33 +/- 13,10 mm Hg e vs. 96,17+ / 12,18 mm Hg, ( $p = 0,01$  e  $p = 0,02$ ) respectivamente). Neste estudo, nenhum dos genótipos do gene *ADR*  $\beta$ 1 R389G apresentou associação com a pressão arterial sistólica. <sup>(158)</sup>.

Peng Y et al. <sup>(158)</sup> também concluiu nestes dois estudos que o genótipo R389R associou-se a maior frequência cardíaca comparado com os outros dois genótipos, (no primeiro estudo: 79,43 +/- 9,90 bpm vs. 74,87 +/- 8,96 bpm, vs. 73,92 +/- 8,18 bpm, respectivamente,  $P = 0,02$ ,  $p = 0,014$  e no segundo estudo: 81,12 +/- 8,99 bpm vs. 74,85 +/- 7,97 bpm e vs. 73,89 +/- 9,12 bpm,  $p = 0,007$ ,  $p = 0,006$ , respetivamente).

Wang H et al. realizaram meta-análise com 5.088 hipertensos e 6.515 controlos. A frequência do alelo G do polimorfismo R389G, foi significativamente menor nos hipertensos do que nos controlos (G versus R:  $P=0,04$ , OR=0,89, IC 95% (0,80-1,00) e concluíram que o alelo G do polimorfismo *ADRB1* R389G poderia conferir menor risco para HTA, especialmente nos asiáticos. <sup>(159)</sup>.

- **Adrenergic Receptor Beta 2 (*ADRB2* R16G) rs1042713**

O  $\beta_2$ -receptor adrenérgico é codificado por um gene de intrões (*ADRB2*) localizado no cromossoma 5 (5q31-32) que contém vários polimorfismos de um único nucleótido (<sup>160</sup>).

O polimorfismo de nucleótido único 46 G> A (G16R) que conduz a uma substituição de aminoácidos de segmentos da Glicina (G) por Arginina (R) na posição 16. Esta variante *ADRB2* R16G associa-se com HTA (<sup>161</sup>).

Este polimorfismo pode aumentar a reatividade vascular, podendo regular assim a pressão arterial (<sup>162</sup>).

Lou Y et al (2011), estudou o polimorfismo A46G no gene *ADRB2* numa população chinesa em relação ao aparecimento de HTA. Concluindo que este polimorfismo se associa a HTA e que o alelo G46 confere mais risco de HTA do que o 46 R. Ao analisar sub-grupos verifica que este polimorfismo associa-se a HTA nos homens, mas não nas mulheres e que o alelo G46 relaciona-se com maior prevalência de hipertensão na população obesa (<sup>163</sup>).

Polimorfismos que atuam a nível celular:

- **G Protein subunit Beta 3 (*GNB3* C825T) rs5443**

As proteínas G e seus recetores têm um papel crucial na transdução de sinal nas células e ativação dos eventos intracelulares.

As proteínas G têm uma estrutura heterotrimérica, composta por 3 subunidades denominadas alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ) e gama ( $\gamma$ ), codificadas por genes distintos. A subunidade alfa ( $\alpha$ ) é a mais característica de cada proteína G e é esta sub-unidade que interage com o recetor, ligando-se ao GTP e regula os sistemas efetores (<sup>164</sup>).

As subunidades  $\beta$  e  $\gamma$  estão associadas por ligações não covalentes e, quando se encontram ligadas à subunidade  $\alpha$ , configuram o estado inativo da Proteína G. (<sup>165</sup>).

O dímero  $\beta$  e  $\gamma$ , para além de servir para ancorar a sub-unidade  $\alpha$ , também têm influência em processos celulares específicos (<sup>166</sup>, <sup>167</sup>) e pode modular a atividade de determinados efetores (<sup>168</sup>).

Devido ao seu papel crucial na função de muitos tipos de células, as anormalidades genéticas nas subunidades das proteínas G têm o potencial de estarem envolvidas na etiologia de uma vasta gama de situações clínicas.

O polimorfismo genético da Sub-Unidade  $\beta 3$  da Proteína G (C825T) rs5443, situa-se no exão 10 do gene GNB3, e apresenta substituição da citosina (C) pela timidina (T) no nucleótido 825, o que induz à formação de um «*splicing*» alternativo dentro do exão 9, no qual os nucleótidos 498-620 são eliminados (<sup>169</sup>, <sup>170</sup>).

Como resultado os aminoácidos 167 a 197 estão ausentes na proteína codificada (designada G $\beta 3$ -s). Esta variante truncada «splice» - G $\beta 3$ -s é uma proteína funcional que confere uma ativação aumentada das proteínas G, facilitando a sinalização intracelular (<sup>169</sup>, <sup>171</sup>).

Esta variante genética foi descrita como associada a várias patologias nomeadamente, HTA (<sup>168</sup>, <sup>170</sup>, <sup>172</sup>, <sup>173</sup>, <sup>174</sup>, <sup>175</sup>), obesidade (<sup>176</sup>), depressão (<sup>177</sup>) e doenças cardiovasculares (<sup>178</sup>).

Outros estudos, no entanto há, em que não se demonstrou a associação desta variante genética com a HTA (<sup>179</sup>, <sup>180</sup>, <sup>181</sup>).

Uma meta-análise de 2013 com um total de 40 estudos caso-controle avaliando 16.518 hipertensos e 20.284 controlos, encontrou associação entre o polimorfismo GNB3 C825T e o risco de HTA (T vs C (OR = 1,09, IC 95%: 1,04-1,19)). No subgrupo dos caucasianos e chineses essa associação era mais evidente. (<sup>173</sup>).

- **ATPase Plasma membrane calcium-transporting 1 (*ATP2B1* C/T) rs2681472**

O gene do transportador 1 da ATPase  $\text{Ca}^{2+}$  (*ATP2B1* A/G rs2681472) emergiu de uma grande meta-análise do *genome-wide association studies* (GWAS), feita em europeus pelo consórcio CHARGE, com identificação novos loci para PA sistólica (PAS) e PA diastólica (PAD) em europeus. O polimorfismo rs2681472 do gene *ATP2B1* foi a única variante genética associada à suscetibilidade de hipertensão arterial com (*odds ratio*, OR 1,17,  $p = 1,7 \times 10^{-8}$ ) (<sup>108</sup>).

O mecanismo pelo qual o polimorfismo rs2681472 do gene *ATP2B1* se associa a risco aumentado de HTA não está claro.

A *ATP2B1* expressa-se no endotélio vascular e regula a homeostase dos níveis de cálcio celular. Tendo assim relevante importância no controlo da contração e dilatação da musculatura da parede vascular (<sup>182</sup>). Experiências em células musculares lisas da veia, mostraram que o gene *ATP2B1* desempenhou um papel importante na libertação de  $\text{Ca}^{2+}$  após estimulação com carbacol ou na despolarização com cloreto de potássio (<sup>182</sup>).

Outras evidências indicaram que os níveis de ARNm de *ATP2B1* em células de músculos lisos de ratos espontaneamente hipertensos foram maiores do que aqueles em controlos não hipertensivos (<sup>182</sup>).

- **Cytochrome P450 Family 17 Subfamily A Member 1 (*CYP17A1* C/T) rs11191548**

Este polimorfismo foi emanado do (GWAS) e associa-se com alterações da pressão arterial (<sup>107</sup>).

Nos seres humanos, o gene *CYP17A1* está localizado no cromossoma 10q24.3, constituído por oito exões e sete intrões.

O gene *CYP17A1* codifica um membro da superfamília de enzimas do citocromo P450. As proteínas do citocromo P450 são monoxigenases que interferem na síntese de esteroides, colesterol e outros lípidos.

O gene CYP17A1 produz a proteína P450c17, é uma enzima importante que catalisa a formação de androgénios (<sup>183</sup>).

Portanto, mutações genéticas do CYP17A1 podem causar a perda da atividade enzimática de P450c17 e potencialmente reduzir a biossíntese de andrógenos.

Este gene expressa-se essencialmente nas glândulas supra-renais e gónadas.

O mecanismo pelo qual o gene CYP17A1 leva a hipertensão não é claro.

- **Solute Carrier Family 30 Member 2 (SLC4A2 C/T) rs2303934**

Este polimorfismo foi emanado do (GWAS). Localiza-se no cromossoma 7q36.1

Sober S et al. (2009) (<sup>184</sup>), verificou que quatro SNPs do SLC (rs10889553, rs2303934, rs10954174, rs11195419) estavam marginalmente associados a valores mais elevados de pressão sanguínea ( $P < 0,1$ ).

Este gene codifica um membro da família de permutadores de aniões de proteínas de transporte de membrana. A proteína codificada regula o pH intracelular. O SLC4A2, designado por permutador de aniões 2, expressa-se em vários tecidos. Funciona como um permutador de  $\text{Cl}^- / \text{HCO}_3^-$  independente de  $\text{Na}^+$  que regula o transporte ácido-base intracelular e trans-epitelial.



**CAPÍTULO II**  
**JUSTIFICAÇÃO PARA A DISSERTAÇÃO**





## II. JUSTIFICAÇÃO PARA A DISSERTAÇÃO

A Hipertensão arterial, afeta um quarto da população adulta em todo o mundo e estima-se o seu aumento para um terço em 2025 <sup>(10)</sup>.

Em Portugal a sua prevalência global na população é cerca de (42%) <sup>(185)</sup>.

Diversas metanálises demonstraram de forma consistente e linear que a elevação da pressão arterial é um poderoso fator de risco de Doença cardiovascular (DCV) e de progressão para insuficiência renal, independentemente doutros fatores de risco vascular. Valores persistentemente elevados de pressão arterial levam a doença cardíaca, vascular e renal <sup>(186, 187)</sup>.

É uma doença com componente genético marcado. A hereditariedade da PA é apoiada pelo fato dos valores tensionais serem mais concordantes entre gêmeos monozigotos do que nos dizigóticos. Efetivamente, vários estudos epidemiológicos revelaram que 20-40% da variação da pressão arterial é determinada geneticamente <sup>(188, 189)</sup>.

A HTA é uma doença complexa, sendo a sua etiologia suscetível de compreender, como sendo um distúrbio multifatorial, resultante de fatores ambientais e genéticos e das suas interações <sup>(190)</sup>.

Foi na década de 80 do século XX e com o advento de novas tecnologias para a deteção de variantes genéticas que Hipertensão passou a ser alvo de estudo genético <sup>(191)</sup>.

A partir daí, muitos estudos têm sido feitos e nas últimas décadas com o advento do GWAS, têm sido identificados alguns genes, em diferentes *loci* que conferem suscetibilidade para o desenvolvimento de HTA.

No entanto a “arquitetura genética” na regulação da pressão arterial permanece ainda desconhecida. Na atualidade, não dispomos de informação de quais as variantes genéticas envolvidas na HTA, suas frequências e os seus efeitos nos fenótipos. Além do que, as interações entre essas variantes genéticas, seus efeitos sinérgicos ou antagónicos, bem como a sua interação com os fatores ambientais, ainda estão pouco elucidados. Motivando assim, um estudo no sentido de esclarecer, as interações entre

os fatores genéticos, ambientais e comportamentais, bem como averiguar qual o risco incremental dos fatores genéticos ao dos fatores de risco ambientais, na eclosão da HTA.

Pensa-se que na base da genética da HTA, encontram-se alterações de vários genes, em que cada um, tem pequenos efeitos independentes, mas quando adicionados têm efeitos cumulativos. Há necessidade de objetivar, qual o poder preditor de cada variante genética, assim como o poder cumulativo de várias variantes genéticas, no risco da HTA. Com recurso a novos discriminadores de risco, como são os Scores de risco genético, podemos avaliar, o impacto cumulativo de várias variantes genéticas, na predição de HTA.

Estes Scores de risco genético poderão, num futuro próximo, ser utilizados na prática clínica diária, como instrumentos de avaliação do poder preditivo de HTA.

Muitos investigadores, em vários estudos, têm também abordado a influência genética no desenvolvimento das lesões de órgãos alvo nos hipertensos, mas isto também permanece pouco esclarecido. Torna-se também importante, avaliar quais as variantes genéticas que intervêm o desenvolvimento de lesões dos órgãos alvo, nos hipertensos.

Em suma um longo caminho, há a percorrer na decodificação da componente genética da HTA, suas interações com os fatores ambientais e sua repercussão nos fenótipos.

Sendo assim, justifica-se uma investigação, com o fim de uma melhor caracterização das bases genéticas da hipertensão, o que poderá reduzir os impactos desta doença na saúde pública, além de abrir caminhos para novos e específicos medicamentos no tratamento desta importante patologia.

### **CAPÍTULO III**

#### **OBJETIVOS**



### **III. OBJETIVOS**

#### **III.1. Objetivo Geral**

#### **III.2. Objetivos Específicos**

##### **III.2.1. Polimorfismos genéticos e aparecimento de Hipertensão Arterial:**

- Investigar quais os polimorfismos genéticos que individualmente aumentam o risco de aparecimento de Hipertensão Arterial.
- Estudar se há interação entre diferentes polimorfismos genéticos no aparecimento de Hipertensão Arterial
- Estudar se existe associação entre os polimorfismos genéticos e os fatores de risco clássicos de HTA na eclosão da Hipertensão Arterial.

##### **III.2.2. Polimorfismos genéticos e aparecimento de lesões nos Órgãos Alvo da Hipertensão Arterial:**

- Avaliar na nossa amostra de Hipertensos o aparecimento de lesões nos órgãos alvo da Hipertensão Arterial. Investigar se algum polimorfismo genético individualmente está relacionado com o aparecimento destas respetivas lesões.
- Investigar se há interação entre polimorfismos genéticos diferentes no aparecimento das lesões nos órgãos alvo.
- Estudar se existe associação entre os polimorfismos genéticos e os fatores de risco clássicos de HTA, no risco de aparecimento das lesões nos órgãos alvo.

##### **III.2.3. Construção de um score de risco genético preditivo de Hipertensão Arterial**

Score de risco genético no grupo total

Score de risco genético por género

- Construção de um score de risco genético para o género feminino
- Construção de um score de risco genético para o género masculino







**CAPÍTULO III**  
**MATERIAL E MÉTODOS**



## **IV. MATERIAL E MÉTODOS**

Para fazer o estudo a que nos propomos, fizemos uma revisão bibliográfica sobre o tema a estudar e calculámos a dimensão da amostra. Posteriormente estabelecemos os critérios de inclusão, exclusão e de emparelhamento, o modo de colheita dos dados e instrumentos a utilizar, assim como as técnicas laboratoriais e de genotipagem. Foram definidas as variáveis a estudar, critérios de valorização e os métodos estatísticos a utilizar na avaliação dos nossos resultados.

### **IV.1. Revisão Bibliográfica**

Recorrendo à consulta da *PUB MED* seleccionámos as referências bibliográficas pela pesquisa das palavras *Hypertension, Gene, polymorphism, genotype, genetic score, GWAS, gene-gene interaction, gene - environment interaction*.

A partir das listagens obtidas seleccionámos os artigos adequados para o presente estudo pelo texto de resumo. Posteriormente foram adquiridos os artigos com o texto completo.

Cingimo-nos à consulta do resumo, quando os artigos se encontravam numa língua que não nos era legível ou referentes a comunicações feitas em Congressos.

## IV.2. Estudo da população

### IV.2.1. Dimensão da amostra populacional

Para fazer um estudo caso-controlo, tivemos de calcular a dimensão da amostra populacional necessária com o fim de definir as variantes genéticas preditoras de risco de HTA.

Segundo estudos previamente efetuados na nossa população o polimorfismo mais prevalente foi o *ACE Ins/Del* rs4340, sendo a prevalência do genótipo DD na nossa população de 39% <sup>(192)</sup>.

A frequência do genótipo DD da ECA na nossa população é alta, comparada com a descrita noutras populações (Quadro 5).

| Região       | Genótipo DD ( % ) | Autor e Ref. Bibliog.            |
|--------------|-------------------|----------------------------------|
| Japão        | 18,3%             | Mizui et al                      |
| Ásia do Sul  | 18,3%             | Sagnella et al                   |
| Chile        | 18,5%             | Jalil et al                      |
| Austrália    | 22,0%             | Smith et al                      |
| França       | 30,6%             | Marre et al                      |
| EUA          | 30,9%             | Lindpaintner et al               |
| Alemanha     | 33%               | Schmidt et al                    |
| Gran Canária | 43,5%             | E. H. Ortega et al <sup>53</sup> |

Enrique Hernandez Ortega et al. Rev Esp Cardiol 2002. <sup>(193)</sup>

**Quadro 5 – Distribuição do genótipo DD da *ACE Ins/Del* rs4340 em diferentes países**

Para calcular o número de casos e controlos necessários para encontrar diferenças na predição da HTA na nossa população, usámos a seguinte fórmula:

Frequência do genótipo DD do *ACE Ins/Del* rs4340 na nossa população (39%) em toda a população (e=5%).

$$n = \frac{\sigma^2 \times p \times q \times N}{e^2(N-1) + \sigma^2 \times p \times q} = \frac{1,96^2 \times 39 \times 61 \times 113528}{5^2(113528-1) + 1,96^2 \times 39 \times 61} = 365$$

$$n = \frac{\sigma^2 \times p \times q \times N}{e^2(N-1) + \sigma^2 \times p \times q} = \frac{1,96^2 \times 39 \times 61 \times 125374}{5^2(125374-1) + 1,96^2 \times 39 \times 61} = 365$$

n = Tamanho da amostra

$\sigma$  = Nível de confiança escolhido, expresso em números de desvio padrão

p = Percentagem com a qual o fenómeno se verifica

q = Percentagem complementar (100-p)

e = Erro máximo permitido

N = Tamanho da população (Indivíduos com mais de 35 anos e menos de 70 anos).

N= 113 528 (Estimativa da população residente a 31 de dezembro de 2015 – Direção Regional de Estatística da Região Autónoma da Madeira)

p (valor encontrado na população geral)

$\sigma$  (nível de confiança de 95%,  $\sigma=1,96$ )

e (o valor definido é 5%).

(<sup>194</sup>)

Para validação do nosso estudo caso-controlo, deveríamos ter uma população alvo de 365 indivíduos que permite encontrar significância estatística para os genótipos de risco mais frequentes.

#### **IV.2.2. População estudada**

O estudo «GENHYMAPE» é um estudo observacional, transversal, de caso controlo com inclusão de indivíduos desde 2007, realizado no Arquipélago da Madeira cuja população é de cerca de 300.000 habitantes.

Os indivíduos participantes no estudo são de raça caucasiana, naturais do Arquipélago da Madeira, sendo que os seus progenitores na 1ª e 2ª geração são igualmente nascidos neste arquipélago e da mesma raça. Procuramos desta forma, que esta população de indivíduos fosse geneticamente homogeneia e representasse assim uma população da Europa do Sul.

### **Estudo caso-controlo:**

Com uma amostra de 1712 Indivíduos (com idade média de  $51 \pm 7,9$  anos; 51% do sexo masculino, constituímos dois grupos consoante tinham ou não HTA.

HTA foi definida quando os pacientes, à entrada deste estudo, já estavam diagnosticados e/ou tinham medicação anti-hipertensiva há mais de 3 meses ou se hipertensos recentemente diagnosticados com pressão arterial sistólica (PAS) / pressão arterial diastólica (PAD)  $\geq 140 / 90$  mmHg medido em pelo menos 3 ocasiões <sup>(51)</sup>.

Sendo assim obtivemos um grupo com 860 casos (com HTA), com idade média de  $51,4 \pm 8$  anos; 53,3% do sexo masculino, e 850 controlos (sem HTA), com idade média de  $50,7 \pm 7,7$  anos; 48,7% do sexo masculino, de modo a não serem significativamente diferentes em termos de sexo e idade.

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética do Hospital Central do Funchal e realizado em de acordo com as orientações apresentadas na Declaração de Helsínquia. O consentimento informado por escrito foi obtido de cada participante, incluindo permissão explícita para as análises de DNA e a coleta de dados clínicos relevantes.

#### **IV.2.2.1. Critérios de inclusão e de exclusão dos casos e controlos**

##### **1- Casos:**

Indivíduos com hipertensão arterial, foram selecionados consecutivamente num intervalo de tempo de 3 anos das consultas de Medicina Geral e Familiar da Região Autónoma da Madeira (RAM) e de Medicina Interna do HCF. O recrutamento para o estudo foi feito pelos seus médicos assistentes.

**Critérios de inclusão** (têm que cumprir todos os critérios):

- Homens ou mulheres;
- Idade > 35 e ≤ 70 anos;
- Com Hipertensão arterial (HTA);
- HTA foi definida – como anteriormente descrita;
- Com possibilidade de dar o consentimento esclarecido para entrar no estudo.

**Critérios de exclusão** (basta a existência de um dos critérios para se excluir o doente):

- Idade ≤ 35 anos ou > 70 anos;
- Hipertensão secundária definida ou provável;
- Impossibilidade de dar o consentimento esclarecido para entrar no estudo;
- Existência de doenças agudas (ex. º tumor ou insuficiência cardíaca grave) que possam comprometer a sobrevivência do doente;
- Excluídos os que receberam medicação para outras patologias que pode afetar a pressão arterial.

##### **2 -Controlos:**

Os controlos, sempre que possível, foram selecionados de forma aleatória dos cadernos eleitorais da RAM com base populacional, ou seja, recorrendo a controlos ambulatoriais com origem na mesma região e recrutados para o estudo telefonicamente.

**Critérios de inclusão dos controles** (devem cumprir todos os critérios, para ser elegível como controle):

- Normotensos (Pressão Arterial Sistólica (PSA) menor que 130 mmHg e / ou Pressão Arterial Diastólica menor que 85 mmHg na média de três medições efetuadas com intervalos de 15 minutos) e sem medicação anti-hipertensiva;
- Que não sofram de doença crônica que obrigue a fazer qualquer terapêutica de modo continuado;
- Com possibilidade de dar o consentimento esclarecido para entrar no estudo.

**Critérios de exclusão** (basta a existência de um dos critérios para se excluir o controle):

Foram excluídos do estudo indivíduos com Hipertensão secundária, insuficiência de órgãos múltiplos, distúrbios mentais, doença inflamatória crônica, grávidas ou se estavam medicados para outras patologias com fármacos que poderiam afetar a pressão arterial.

- Hipertensão arterial previamente diagnosticada;
- Impossibilidade de dar o consentimento esclarecido para entrar no estudo;
- Existência de doenças crônicas que obriguem a medicação.

Todos os indivíduos colheram sangue para análise bioquímica e de ADN.

Os indivíduos Hipertensos colheram urina de 24 horas para avaliação da clearance da creatinina, taxa de filtração glomerular e ionograma urinário.



### **IV.3. Colheita de dados e instrumentos e materiais utilizados**

#### **História Clínica**

Na fase de recrutamento dos indivíduos, mais precisamente na 1ª consulta médica, é realizado pelo médico, a todos os participantes um questionário padronizado para recolha de dados demográficos (idade e sexo), de estilos e hábitos de vida (sedentarismo, tabagismo, consumo de álcool) e terapêutica medicamentosa.

Também foi indagado aos participantes sobre a história pregressa de doença cardiovascular pessoal ou familiar. Todas estas informações são obtidas dos participantes sob forma de pergunta aberta.

#### **Avaliação da pressão arterial**

Avaliada a pressão arterial, aquando da consulta médica, por um médico com mais de 5 anos de exercício da profissão. Foi feita a todos os indivíduos após 10 min de repouso, na posição sentada, no braço direito utilizando um esfigmomanómetro Welch Allyn padrão (fases I a V) e foi registada a média de 3 leituras feitas com intervalo de 2 min<sup>(51)</sup>.

#### **Exame físico com auscultação cardíaca e pulmonar**

Feito durante a consulta médica a todos os participantes uma auscultação cardíaca e pulmonar com avaliação da frequência cardíaca.

#### **Medidas antropométricas**

Determinadas as seguintes medidas antropométricas: peso, altura, perímetro abdominal e relação cintura-anca.

A altura foi medida em centímetros e obtido o peso em quilogramas. Feito o cálculo do índice de massa corporal (IMC), utilizando a seguinte formula:  $\text{Peso (Kg)} / \text{Altura}^2 \text{ (m)}$  <sup>(195)</sup>.

O perímetro abdominal foi medido a uma distância média entre a grelha costal inferior e a crista ilíaca lateral em centímetros. A relação cintura/anca foi calculada dividindo o valor do perímetro abdominal (cm) pelo valor do perímetro da anca (cm). Para as mulheres, o valor da relação cintura/anca deve ser inferior a 0,80 cm e para os homens, o valor deve ser inferior a 0,90 cm.

Os dados foram colhidos durante a consulta médica e registados numa folha de protocolo em papel que foi criada com objetivo específico do presente trabalho. Posteriormente os dados foram registados num programa em Excel e transferidos para um ficheiro SPSS, com o fim de obter resultados automatizados através de instruções pré-programadas. Procurou-se que o anonimato do doente fosse sempre salvaguardado, atribuindo um número de identificação próprio com ocultação do seu nome. As amostras de sangue colhidas para o laboratório e para a extração de DNA, são identificadas por esse numero de identificação e são enviadas para o respetivo laboratório sem identificação do nome próprio do indivíduo.

Os investigadores clínicos não tinham conhecimento dos resultados genéticos dos indivíduos.

### **Velocidade de onda de pulso carotídeo-femoral (VOP)**

Determinada a velocidade de onda de pulso (VOP) por Tonometria, através de um dispositivo automático, o *Complior*.

A VOP (carotídeo-femoral) é a velocidade à qual se desloca a onda de pressão ao longo da parede da artéria carótida até à artéria femoral. É calculada através da fórmula:

$$V = D / \Delta T$$

D – é a medida em metros entre o ponto de palpação do pulso carotídeo e o femoral. São obtidas simultaneamente duas ondas de pulso, registadas por dois sensores, sendo um colocado na artéria carótida comum direita e o outro sobre a artéria femoral direita.

$\Delta T$  – é o tempo que a onda de pressão leva a percorrer esses dois pontos. O cálculo da VOP é feito pelo dispositivo automático, o *Complior*. <sup>(196)</sup>

A VOP, foi determinada pela mesma Técnica de Cardiopneumologia, com mais de 5 anos de experiência com o uso do *Complior*.

### **Eletrocardiograma de 12 derivações**

Feito a todos os participantes aquando da consulta médica, por uma Técnica de Cardiopneumologia e posteriormente avaliado por uma Médica Internista com mais de 10 anos de exercício da profissão.

### **Ecocardiografia**

Realizada aos Hipertensos, utilizando o Ecocardiógrafo, por 3 médicos da especialidade de Cardiologia e com treino em ecocardiografia há mais de 5 anos.

### **Retinografia**

A Retinografia foi feita aos Hipertensos através do «*Retinografo Canon CR -2 Plus Digital Retinal Camera*» – por Técnicas Ortoptistas. A cada doente são feitas pelo menos 2 imagens de cada fundo ocular. Posteriormente estas imagens foram observadas pôr uma Médica de Medicina Interna e por uma Médica Oftalmologista, ambas com mais de 10 anos de exercício da profissão.

## IV.4. Análise bioquímica

### Análise Bioquímica

Na admissão do estudo, foram efetuadas a todos os participantes um estudo analítico de rotina, incluindo: hemograma com plaquetas, estudo da função renal e hepática, ionograma sérico. Foi também determinado as concentrações séricas colesterol total (CT), triglicéridos (TG), colesterol de lipoproteínas de alta densidade (HDL-C) e colesterol de lipoproteínas de baixa densidade (LDL-C), de glicose em jejum, hemoglobina glicosilada (HbA1c), PCR as e fibrinógeno.

As amostras de sangue foram extraídas após 14-16 horas de jejum noturno e o plasma foi preparado para a quantificação dos perfis biológicos.

Os valores de colesterol total (CT), triglicéridos (TG), colesterol de lipoproteínas de alta densidade (HDL-C) e colesterol de lipoproteínas de baixa densidade (LDL-C) e de glicose, foram quantificados no soro, com um auto analisador “AU 5400” (Beckman Coulter) através de uma técnica enzimática. Para o colesterol HDL e LDL foi usada uma técnica enzimática direta.

A Proteína C Reativa de alta sensibilidade foi quantificada por um aparelho automático “AU 5400” (Beckman Coulter), pela técnica de Imunoturbidimetria.

A colheita para determinação do Fibrinogénio, foi feita com o doente em jejum, num tubo com citrato de sódio e foi analisador automático “ACL TOP 700”.

Os Hipertensos colheram urina de 24h para avaliação da clearance da creatinina, ionograma urinário e tx de filtração glomerular pelos métodos:

- Creatinúria – método cinético de Jaffe não compensado
- Clearance de creatinina <sup>(197)</sup>

$$\text{Clearance da Creatinina} = \frac{U_{vol} \times U_{creat}}{P_{creat} \times \text{Tempo (min)}}$$

*U vol – Volume de urina*

*U creat – Creatinina na urina*

*P creat – Creatinina plasmática*

*Tempo (mim) – Tempo em minutos*

- Ionograma urinário – método *Ion Selective Electrode* Indireto
- Microalbuminúria – método Imuno-turbidimétrico

#### **IV.5. Variáveis estudadas**

##### **Hipertensão Arterial**

Definida como previamente descrita.

##### **História familiar de Doença cardiovascular (DCV):**

Considerou-se que os indivíduos tinham história familiar de doença coronária se o pai ou irmão tivessem sido diagnosticados com DCV antes dos 55 anos de idade ou a mãe ou irmã antes dos 65 anos de idade <sup>(198)</sup>.

##### **Diabetes**

O diagnóstico de Diabetes *Mellitus* Tipo 2 (DMT2), foi definida pela presença de uma glicémia em jejum  $\geq 126$  mg/dL (jejum – definido quando não houve consumo de calorias nas últimas 8 horas) ou glicose sérica  $\geq 200$  mg /dL (avaliada em qualquer medição) ou hemoglobina glicosilada (HbA1c)  $\geq 6,5\%$  ou doentes a fazer terapêutica antidiabética <sup>(199)</sup>.

### **Sedentarismo**

Sedentarismo, definido quando os indivíduos não praticavam pelo menos 150 minutos/semana de atividade física moderada a vigorosa <sup>(198)</sup>.

### **Tabagismo**

Inquirido aos indivíduos se tinham hábitos tabágicos tendo sido quantificados e se eram ex-fumadores.

### **Consumo de álcool**

Quantificou-se o consumo de álcool em gramas por dia, sendo considerado consumo superior ao recomendado, quando se fosse superior a 20 g/dia no sexo masculino e 10 g/dia no sexo feminino <sup>(198)</sup>.

Um elevado consumo de álcool (> 60 g/dia), um consumo ligeiro (<12 g/dia), um consumo moderado (12–24 g/dia)

### **Consumo estimado de Sal**

A ingestão de sal estimada foi derivada do sódio urinário nas 24h como: 1mmol / 24 h de sódio = 0,05844 g / dia de sal. <sup>(200)</sup>

### **Índice de Massa Corporal (IMC)**

Definido como IMC normal, quando < 25 Kg/m<sup>2</sup>, Excesso de peso com valores entre 25 – 29,9 Kg/m<sup>2</sup> e Obesidade se ≥ 30 Kg/m<sup>2</sup> <sup>(195)</sup>.

## **Dislipidemia**

A dislipidemia foi definida como LDL > 150 mg/dl, HDL < 40 mg/dL para os homens e < 45 mg/dL para as mulheres, e Triglicéridos > 150 mg/dl <sup>(198)</sup>.

## **Insuficiência Renal**

Considerada insuficiência renal quando:

- Insuficiência renal grave - Taxa de filtração glomerular < 30 mL/min
- Insuficiência renal moderada - Taxa de filtração glomerular 30- 60 mL/min

Considerada Lesão renal quando:

- Doentes com Taxa de filtração glomerular > 60 mL/min, mas com microalbuminúria 30 a 300 mg na urina 24 horas.

<sup>(201)</sup>

## **Cardiopatia Hipertensiva**

Considerou-se cardiopatia hipertensiva quando apresentavam critérios de hipertrofia ventricular esquerda (HVE) quer por eletrocardiograma ou no ecocardiograma/doppler apresentavam critérios de hipertrofia ventricular esquerda ou disfunção diastólica.

- **Critérios de hipertrofia ventricular esquerda (HVE) por eletrocardiograma:**

Critérios de hipertrofia ventricular esquerda (HVE)

- Desvio axial esquerdo;
- Índice de Sokolow: SV1+RV5 > 35 mm;
- Índice de Cornell:
  - SV3+RV6 > 8mm no homem,
  - SV3+RV6 > 20mm na mulher.

- **CrITÉRIOS de hipertrofia ventricular esquerda (HVE) e disfunção diastÓlica pelo ecocardiograma:** <sup>(202, 203)</sup>

#### Disfunção diastÓlica

- Não (0-1 critÉrios), n (%)
- Indeterminado (2 critÉrios), n (%)
- Sim (3-4 critÉrios), n (%)

#### Hipertrofia

- Não, n (%)
- Sim, n (%)

#### Geometria

- Normal (RWT <0,42 e Massa normal), n (%)
- Remodeling* Concêntrico (RWT > 0,42 e Massa normal), n (%)
- Hipertrofia Concêntrica (RWT > 0,42 e Massa aumentada), n (%)
- Hipertrofia Excêntrica (RWT <0,42 e Massa aumentada), n (%)

#### Massa Indexada

- Normal, n (%)
- Aumento Ligeiro, n (%)
- Aumento Moderado, n (%)
- Aumento Grave, n (%)

### **Retinopatia hipertensiva**

- EstÁdio I: estreitamento arterial
- EstÁdio II: EstÁdio I associado a sinais de cruzamento arterio-venoso
- EstÁdio III: EstÁdio II associado a hemorragias e exsudados
- EstÁdio IV: EstÁdio III associado a edema da papila

<sup>(204)</sup>



**Doença Vascular Cerebral** (Acidente Vascular Cerebral (AVC) ou Acidente Isquémico Transitório (AIT)).

Definiu-se AVC: Déficits neurológicos com mais de 24 horas e com comprovação por Tomografia axial computadorizada. <sup>(205)</sup>

Definiu-se AIT: Quando os déficits neurológicos são temporários – **duram alguns minutos ou horas**, desaparecendo depois completamente dentro de 24 horas.

### **Software utilizado**

O *software* utilizado foi o *IBM SPSS Statistics*, versão 19. Uma vez que este *software* não efetua a comparação da performance diagnóstica por análise comparativa das AUC das curvas ROC, recorreu-se a um outro tipo de *software* específico para este tipo de análise, nomeadamente o teste DeLong com o programa MedCalc versão 14.10.2.0.

## **IV.6. Análise Genética**

A genotipagem dos indivíduos foi realizada na Universidade da Madeira - Laboratório de Genética Humana sob a direção técnica do Sr. Professor António Brehm.

A partir dos leucócitos do sangue total, foi extraído ADN, usando um método padronizado de *salting-out*, de forma a obter uma concentração aproximada de 50-80 ng/μl. A genotipagem dos 13 marcadores (Tabela 1) foi realizada em placas óticas de 96 poços, com recurso à técnica *TaqMan* (Applied Biosystems/Life Technologies/ThermoFisher Scientific), conforme as especificações do fornecedor (Tabela 2): *ACE I/D*, *ACE A2350G*, *AGT T174M* rs4762 (C\_1985480\_20), *AGT M235T* rs699 (C\_1985481\_20), *AGTR1 A1166C* rs5186 (C\_3187716\_10), *CYP11B2 C-344T* rs1799998 (C\_8896484\_10), *ADRB2 R16G* rs1042713 (C\_2084764\_20), *ADD1 G460W* rs4961 (C\_11764545\_20), *SCNN1G G-173A* rs5718 (C\_894888\_10), *GNB3 C825T* rs5443

(C\_\_2184734\_10), *ATP2B1* A/G rs2681472 (C\_\_16057071\_10), *CYP17A1* T/C rs11191548 (C\_\_31979323\_10) e *SLC4A2* C/T rs2303934 (C\_\_15972981\_20). Após a amplificação no aparelho *ABI Prism 7300 Real-Time PCR System* (Applied Biosystems/ThermoFisher Scientific), os resultados foram analisados com recurso ao *7300 System Sequence Detection Software (SDS)* (Applied Biosystems /ThermoFisher Scientific), com a respectiva atribuição de genótipos, sem qualquer conhecimento prévio dos dados clínicos individuais. O controlo de qualidade às técnicas de genotipagem fez-se com a inclusão de um controlo negativo (*non-template control/NTC*) em cada placa de 96 poços. Somente foram consideradas para posterior análise as amplificações cujo *NTC* não ultrapassou a linha *cut-off* de amplificação. Efetuaram-se duplicados cegos para todos os ensaios *TaqMan* utilizando cerca de 20% do total de amostras. A genotipagem foi ainda confirmada por sequenciação direta de 10% das amostras para todos os *SNPs*. Os resultados foram replicativos e tiveram uma correspondência na ordem dos 95-99% em relação à técnica *TaqMan* e/ou ao primeiro ensaio *TaqMan*.

**Tabela 1 – SNPs incluídos no estudo.**

| DB SNP ID  | Gene    | Designação no presente estudo | Cromossoma | Alteração na proteína |
|------------|---------|-------------------------------|------------|-----------------------|
| rs4340     | ACE     | ACE I/D                       | 17         | -                     |
| rs4343     | ACE     | ACE A2350G                    | 17         | ACA→ACG, T202T        |
| rs699      | AGT     | AGT M235T                     | 1          | ACG→ATG, M268T        |
| rs4762     | AGT     | AGT T174M                     | 1          | ACG→ATG, T207M        |
| rs5186     | AGTR1   | AGTR1 A1166C                  | 3          | -                     |
| rs1799998  | CYP11B2 | CYP11B2 C-344T                | 8          | -                     |
| rs1042713  | ADRB2   | ADRB2 R16G                    | 5          | AGA→GGA, R16G         |
| rs4961     | ADD1    | ADD1 G460W                    | 4          | GGG→TGG, G460W        |
| rs5718     | SCNN1G  | SCNN1G G-173A                 | 16         | -                     |
| rs5443     | GNB3    | GNB3 C825T                    | 12         | TCC→TCT, S274S        |
| rs2681472  | ATP2B1  | ATP2B1 A/G                    | 12         | -                     |
| rs11191548 | CYP17A1 | CYP17A1 T/C                   | 10         | -                     |
| rs2303934  | SLC4A2  | SLC4A2 C/T                    | 7          | -                     |

**Tabela 2 – Ensaios TaqMan® SNP Genotyping com os *primers*/sondas fornecidos.**

| DB SNP ID  | Referência<br><i>TaqMan</i> | Sequência alvo [VIC/FAM]                                |
|------------|-----------------------------|---|
| rs4340     | C__29403047_10              | GGTGAGCTAAGGGCTGGAGCTCAAG[C/G]CATTCAAACCCCTACCAGATCTGAC |
| rs4343     | C__11942562_20              | CAGATCTGACGAATGTGATGGCCAC[A/G]TCCCGGAAATATGAAGACCTGTTAT |
| rs699      | C__1985481_20               | CAGGGTGCTGTCCACACTGGCTCCC[A/G]TCAGGGAGCAGCCAGTCTTCCATCC |
| rs4762     | C__1985480_20               | TGGGGCTGTGAACACGCCCACCACC[A/G]TGGACAGCAGCAGCTGGGCCTGGCT |
| rs5186     | C__3187716_10               | TGCAGCACTTCACTACCAAATGAGC[A/C]TTAGCTACTTTTCAGAATTGAAGGA |
| rs1799998  | C__8896484_10               | TTTATCTTATCGTGAGATGAGAGGG[A/G]GCCTTGGATTCTTTTAATAGACTTT |
| rs1042713  | C__2084764_20               | CAGCGCCTTCTTGCTGGCACCCAAT[A/G]GAAGCCATGCGCCGGACCACGACGT |
| rs4961     | C__11764545_20              | CCGGGGCGACGAAGCTTCCGAGGAA[G/T]GGCAGAATGGAAGCAGTCCCAAGTC |
| rs5718     | C__894888_10                | AGGCACTGCGCGGTGGCCAGGAAG[A/G]CGCAGCGCGGCCGGGCTGGGGCGCA  |
| rs5443     | C__2184734_10               | AGAGCATCATCTGCGGCATCACGTC[C/T]GTGGCCTTCTCCCTCAGTGGCCGCC |
| rs2681472  | C__16057071_10              | TGCTTGAATGCTCTTCTTGACGCT[A/G]TTTACATGGCAGACCCACTATGAAC  |
| rs11191548 | C__31979323_10              | ATTAAATAGTTTCCATAACATGGAA[C/T]GTGGGTAAGGTTCTACCTAATAC   |
| rs2303934  | C__15972981_20              | CTGGGCTGAGCCCTGTCTGTGTCCC[C/T]CAGCGTGAGCTGCCGCTCCAGCAC  |

\* polimorfismo *Alu* substituído no ensaio *TaqMan* pelo SNP rs4341, com o qual se encontra em estrito desequilíbrio de ligação alélica.

**Tabela 3– *Primers* de PCR/sequenciação de Sanger.**

| DB SNP ID  | <i>Primers (Forward / Reverse)</i>                      |
|------------|---|
| rs4340     | GTCACCTTTATGTGGTTTCGCCAAT / GCAGCCTGGTTGATGAGTTC        |
| rs4343     | TGGCTCACGCCTGTAATCCCAGC / TCATGCCATTCTCCTGCCTCAGC       |
| rs699      | CTCCAAGGCCTGACTGGCTGAT / TCTCTCTATCTGGGAGCCTTGA         |
| rs4762     | TGGATGTATTGATTCAACTAGGC / GGCTAGGGAGATTGCATTTCTG        |
| rs5186     | TGGATGTATTGATTCAACTAGGCATCA / GGCTAGGGAGATTGCATTTCTGTCA |
| rs1799998  | CTCACATGGAACCACTGCGCTCC / CCTTCTCCAGGGCTGAGAGGAG        |
| rs1042713  | CAGGCGTCAGCTGCGGCACGCAG / GTCCAGTACGATGAGAGACATGAC      |
| rs4961     | TGTCACAGGTTACTCCTTTGCT / AGTCTCTCTCGTCCGGTGACTG         |
| rs5718     | GCACCTGCCATCTGGACGTGAG / GCGGGCCACGACTTCACAACGC         |
| rs5443     | CATCTGCACGGGCTCGGATGAC / GCAGTTGAAGTCGTCGTAGCC          |
| rs2681472  | GGCTATATAAGATATGCACGGTG / CTCACCTTCACTTGCACTTTCTCG      |
| rs11191548 | GGCAATAGCTAGATCATAGTTAC / CACGAATAGCCTGAGACAACCTAC      |
| rs2303934  | GAAGCCTGGGTGTGGACTCAG / CTTGGAGCGGGTGATGCCAGCTG         |

#### IV.7. Modelos de hereditariedade genética

Cada marcador genético tem dois alelos ex: A e B, existindo três possibilidades de genótipos:

- 2 homozigotos - AA e BB
- 1 heterozigoto - AB

A Penetrância é a proporção de indivíduos portadores de uma variante genética que se expressa no seu fenótipo, sendo assim é o resultado de uma relação específica entre genótipo e fenótipo.

Os modelos genéticos (dominante, recessivo, multiplicativo e aditivo), são modelos padrão de Penetrância da doença.

|           | AA | AB | BB |
|-----------|----|----|----|
| Casos     | a  | b  | c  |
| Controlos | d  | e  | f  |

|   |           |         |         |    |
|---|-----------|---------|---------|----|
| <b>1- Modelo dominante: o alelo B confere risco (AA vs AB+BB)</b>   |           | AA      | AB + BB |    |
|   | Casos     | a       | b + c   |    |
|   | Controlos | d       | c + f   |    |
| <b>2- Modelo recessivo: 2 cópias do alelo B são requeridas para conferir risco (AA+AB vs BB)</b>                                    |           | AA + AB |         |    |
|   | Casos     | a + b   |         |    |
|   | Controlos | d + e   |         |    |
| <b>3- Modelo multiplicativo: o risco aumenta <math>\gamma</math>-fold para o genótipo AB e <math>\gamma^2</math>-fold para o BB</b> |           | A       | B       |    |
|   | Casos     | 2a + b  | b + 2c  |    |
|   | Controlos | 2d + e  | e + 2f  |    |
| <b>4- Modelo aditivo: o risco aumenta <math>\gamma</math>-fold para o genótipo AB e <math>2\gamma</math>-fold para BB</b>           |           | AA      | AB      | BB |
|   | Casos     | A       | b       | c  |
|   | Controlos | D       | e       | f  |

*Legenda:* estudo caso - controlo

a, b, c, d, e, f - frequências dos genótipos observados nos casos e controlos

$\gamma$  - é o parâmetro de penetrância genética

(206)

**Quadro 6 – Tabela de modelos genéticos**

## IV.8. Modelos de *Score* de risco genético

### IV.8.1. Modelo de *Score* genético aditivo

O modelo de *Score* genético aditivo é um modelo não ponderado. Cada indivíduo pode ter 0, 1 ou 2 alelos de risco, sendo 0 o genótipo homozigótico selvagem, 1 o heterozigoto e 2 o genótipo homozigótico mutado. O efeito final no risco em cada indivíduo é o somatório do número de cópias de alelo de risco. Na nossa amostra, com 14 genes o número máximo de alelos de risco para cada indivíduo era 28.

### IV.8.2. Modelo de *Score* de risco genético multiplicativo

O modelo de *Score* genético multiplicativo é um modelo ponderado. Calcula-se para cada genótipo a predição do risco (OR). O score multiplicativo final corresponde ao produto dos OR de todas as variáveis genéticas em estudo. <sup>(207)</sup>

## IV.9. Análise estatística

### IV.9.1. Variáveis contínuas e categóricas

Na análise estatística, as **variáveis categóricas** estão apresentadas pela sua frequência absoluta e relativa, tendo sido utilizado o teste do qui-quadrado ou o teste exato de Fischer para testar a sua significância.

As **variáveis contínuas** estão expressas pela sua média e respetivo desvio padrão ou, no caso das variáveis bioquímicas, pela sua mediana (mínimo – máximo). Como temos duas amostras de populações independentes, para realizarmos o teste t de comparação de médias para amostras independentes (teste paramétrico), temos como pressupostos, a normalidade das distribuições da variável dependente e a homogeneidade das

variâncias nos dois grupos, avaliadas pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e pelo teste de Levene, respetivamente. Apesar da violação do pressuposto da normalidade e uma vez que ambos os grupos têm uma amostra de grandes dimensões, a distribuição aproxima-se da distribuição normal pelo que utilizámos o teste t.

Para as variáveis expressas pela mediana recorreremos ao teste não-paramétrico de Mann-Whitney para a comparação dessas mesmas amostras.

#### **IV.9.2. Odds ratio**

Um *Odds Ratio* (OR) é uma medida de associação entre o fator de risco e o aparecimento do evento / doença. O OR representa as hipóteses de um resultado (doença) ocorrer, com a presença de um fator de risco, em comparação com as hipóteses do resultado (doença) ocorrer na ausência desse fator de risco <sup>(208)</sup>. Dizemos que existe uma frequência equivalente do fator nos dois grupos quando o  $OR=1$ . Para valores de  $OR>1$  a frequência de exposição é maior entre os casos indicando um risco aumentado de doença com a exposição. Se  $OR<1$ , a frequência de exposição é mais baixa entre os casos indicando que a exposição é um fator protetor em relação à doença. Os índices de *Odds* são mais comumente usados nos estudos caso-controlo.

#### **IV.9.3. Equilíbrio de Hardy-Weinberg**

O Equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (EHW), é um princípio da genética das populações, que defende que numa população suficientemente grande e na ausência de seleção, migração ou mutação, a frequência com que ocorre um alelo, permanecerá constante com o passar das gerações <sup>(209)</sup>.

Quando há desvios do EHW poderá ser por endogamia, estratificação ou seleção da população.

Exemplificando: Um único locus genético com dois alelos, sendo o alelo dominante “A” e o alelo recessivo “a”, com frequências alélicas  $p$  e  $q$  respectivamente, sendo a frequência (A) =  $p$  e a frequência (a) =  $q$  onde  $p+q = 1$ . Para que os alelos dos controles estejam em equilíbrio de Hardy-Weinberg, teremos a frequência (AA) =  $p^2$  para os homozigotos AA (dominantes) na população, a frequência (aa) =  $q^2$  para os homozigotos aa (recessivos), e frequência (Aa) =  $2pq$  para os heterozigotos.

Para averiguarmos se a nossa população está em equilíbrio de *Hardy-Weinberg*, os genótipos dos controles devem estar em equilíbrio. Para tal utilizámos um teste estatístico do Qui-quadrado de *Pearson*, com a correção para as análises múltiplas pela Correção de Bonferroni [ $p < 0,004$  ( $0,05/14(\text{genes}) = 0,004$ )], a fim de verificarmos se as frequências genotípicas observadas são estatisticamente diferentes das esperadas.

Na nossa população estudamos somente as variantes genéticas que estavam em equilíbrio *Hardy-Weinberg*.

#### **IV.9.4. Análise Multivariada**

##### **IV.9.4.1. Modelo de Regressão Logística simples / Seleção das variáveis a incluir no modelo**

O objetivo da análise de regressão logística é encontrar o melhor ajustamento de forma a ser o mais parcimonioso, quer do ponto de vista estatístico quer do ponto de vista clínico.

Devemos começar o processo de seleção das variáveis, com uma análise univariada de cada variável.

Após a análise univariada, seleccionámos as variáveis candidatas à análise multivariada, utilizando o método proposto por Hosmer, D.W. & Lemeshow, S. (1989), isto é, qualquer variável que apresentar um valor- $p$  inferior a 0,25 deverá ser candidata ao modelo multivariado, assim como as variáveis com importância biológica.

O método utilizado para a seleção dessas variáveis foi o método *stepwise* que consiste em seleccionar, de entre as  $p$  variáveis candidatas ao modelo, “o melhor conjunto”. O

método que utilizaremos para a seleção das variáveis é o método de seleção passo a passo, *stepwise*, no qual as variáveis são selecionadas por inclusão e/ou exclusão no modelo de forma sequencial, com base em algoritmos estatísticos, que verificam a “importância” dessas mesmas variáveis.

Este método, *stepwise*, baseia-se na determinação de uma regra de decisão com um valor-p de entrada e um valor-p de saída.

Os limites máximo e mínimo que iremos fixar para inclusão e exclusão das variáveis, são os sugeridos por Hosmer, D.W. e Lemeshow, S. (1989), i.e., 0,15 como valor-p de entrada e 0,20 como valor-p de saída. A multicolinearidade foi analisada com recurso à avaliação da matriz de correlações. Procedeu-se também à validação dos pressupostos por intermédio da análise gráfica dos resíduos e ao diagnóstico de casos influentes. A significância dos modelos obtidos foi analisada pelo teste da razão das verossimilhanças.

#### **IV.9.4.2. Avaliação e ajuste do modelo**

##### **Medidas de calibração e discriminação dos modelos**

Para a validação de um modelo temos que ter em conta a discriminação e a calibração do instrumento de previsão.

A discriminação define a qualidade com que o modelo discrimina entre os pacientes e é representada pela área sob as curvas (*Area Under Curve – AUC*) *Receiver Operating Characteristics* (ROC). As curvas ROC descrevem a capacidade discriminativa de um teste diagnóstico para um determinado número de valores *cut off point*. Isto permite pôr em evidência os valores para os quais existe maior otimização da sensibilidade em função da especificidade. O ponto, numa curva ROC, onde isto acontece é aquele que se encontra mais próximo do canto superior esquerdo do diagrama.

Por outro lado, as curvas ROC permitem quantificar a exatidão de um teste diagnóstico, já que, esta é proporcional à área sob a curva ROC, isto é, tanto maior quanto mais a curva se aproxima do canto superior esquerdo do diagrama. Sabendo isto, a curva será



útil, também, na comparação de testes diagnósticos, tendo um teste uma exatidão tanto maior, quanto maior for a área sob a curva ROC.

A calibração é a correlação entre a previsão e o resultado, ou seja, se o modelo proposto pode explicar bem o que observa e utilizam-se as estatísticas *goodness-of-fit* (técnica de *Hosmer-Lemeshow*). Um método não paramétrico que compara as áreas sob as curvas ROC associadas a dois ou mais testes diagnósticos aplicados aos mesmos indivíduos é proposto por DeLong et al (1988), para tal foi utilizado o *software* estatístico MedCalc versão 14.10.2.0. com a finalidade de testar a bondade do ajustamento.

### **Modelos de «Data mining» MDR**

O método *Multifactor Dimensionality Reduction* (MDR) é uma estratégia *data mining*, inicialmente proposta por Ritchie et al (2001) <sup>(210)</sup>. Tem uma abordagem de mineração de dados não paramétrica, mas que não assume nenhum modelo genético específico. Tem como objetivo detetar e caracterizar combinações entre variantes genéticas e ambientais que interagem, interferindo no resultado – variável classe (caso-controlo). O MDR procura exaustivamente o espaço de k combinações de marcadores e para cada combinação faz um classificador. Este processo de classificação ocorre utilizando validação cruzada estratificada com fator 10. MDR identifica k formas de interações, procurando de forma exaustiva e calcula a associação entre cada interação com a doença por meio de validações cruzadas. A abordagem é baseada na redução do espaço de representação dos dados, facilitando a deteção de interações. O MDR é uma ferramenta estatística amplamente usada para detetar interação entre marcadores ou epistasia <sup>(210, 211)</sup>.

### **Dendograma**

Através dos Dendogramas está representado o nível de interação genética (consoante a cor):

Com a cor Vermelha – estão representadas interações sinérgicas de grau elevado (Epistasis)

Com a cor Laranja – estão representadas interações sinérgicas de grau moderado (Epistasis)

Com a cor Verde – estão representadas interações sinérgicas de grau ligeiro (Epistasis)

Com a cor Amarela – Inexistência de interação sinérgica (Redundância)

## **CAPÍTULO IV**

### **RESULTADOS**



## V. RESULTADOS

Vamos iniciar a apresentação dos resultados deste trabalho, por uma breve descrição da população que foi alvo do estudo, seguida dos principais aspetos que nos propusemos investigar.

### V.1. Resultados – Introdução

#### V.1.1. Caraterização da população

Foram avaliados 1712 indivíduos com idade média de  $51 \pm 7,9$  anos, 873 (51%) do género masculino e 839 do sexo feminino (48,7%). Foram constituídos dois grupos, um com os que apresentavam hipertensão arterial (HTA) (n=860) e outro com os que não apresentavam doença hipertensiva (n=852). Procurámos que não existissem diferenças significativas entre eles, em termos de sexo e idade. Foi efetuado um estudo caso-controlo e comparados os dados do exame objetivo, caraterísticas clínicas e os parâmetros bioquímico-laboratoriais na população hipertensa e controlo.

#### V.1.2. Variantes genéticas estudadas

Determinados em ambos os grupos de casos e controlos as 14 variantes genéticas: *ACE Ins/Del* rs4340, *ACE A2350G* rs4343, *AGT T174M* rs4762, *AGT M235T* rs699, *AGTR1 A1166C* rs5186, *CYP11B2 -344 C/T* rs1799998, *ADRB1 R389G* rs1801253, *ADRB2 R16G* rs1042713, *ADD1 G460T* rs4961, *SCNN1G G-173A* rs5718, *GNB3 C825T* rs5443, *ATP2B1 A/G* rs2681472, *CYP17A1 T/C* rs11191548, *SLC4A2 C/T* rs2303934, descritas como associadas à HTA.

Em todas as variantes genéticas foram estimadas as frequências genotípicas, em ambos os grupos e verificado se se encontravam em conformidade com o equilíbrio de *Hardy-Weinberg*. Todas se encontravam dentro deste equilíbrio exceto o caso da variante

*SLC4A2* rs2303934 que, por esse motivo, não foi considerada no presente estudo. Todos os resultados são apresentados com as 13 variantes genéticas que estavam em equilíbrio.

Após a determinação nos 1712 indivíduos dos genótipos associados com a Hipertensão Arterial comparámos gene a gene as diferenças entre casos e controlos.

Posteriormente avaliamos, por análise multivariada, os genes considerados significativos na análise univariada.

### **V.1.3. Fatores de risco não genéticos estudados**

No presente estudo foram investigados nos casos e nos controlos a história familiar de HTA, obesidade, diabetes, sedentarismo, hábitos alcoólicos e tabágicos e a sua associação com o aparecimento de HTA.

### **V.1.4. Estudo combinado dos fatores de risco não genéticos e genéticos**

#### **V.1.4.1. Estudo multivariado**

Foi investigada através de duas análises de regressão logística a associação dos fatores de risco ambientais e genéticos no aparecimento de HTA.

##### **V.1.4.1.1 Capacidade Preditiva da junção dos Fatores Genéticos e Ambientais**

Realizadas duas Curvas ROC, a primeira com os fatores ambientais que permaneceram no primeiro modelo multivariado e a segunda envolvendo estes e as variantes genéticas significativas no segundo modelo.

#### **V.1.4.2. Interação gene-gene**

Utilizando vários métodos estatísticos como sejam os modelos de *Data mining* nomeadamente *Multifactor Dimensionality Reduction* (MDR), foram analisadas as interações gene-gene, das 13 variantes genéticas, no aparecimento de HTA.

#### **V.1.4.3. Interação gene-ambiente**

Igualmente com recurso a modelos estatísticos (MDR) foram estimadas as interações gene-ambiente, das variantes genéticas que se associaram à HTA na análise univariada e dos fatores de risco ambientais estudados.

#### **V.1.5. Estudo genético em subgrupos – Género, Diabéticos, Obesos e Consumo de Sal**

Com a população estudada, foram constituídos os seguintes subgrupos:

1. Género
2. Existência de Diabetes
3. Existência de Obesidade
4. Consumo de sal
  - 4.1. Elevado consumo de sal
  - 4.2. Baixo consumo de sal

Dentro de cada subgrupo foi efetuado um estudo caso-controlo (ter ou não HTA) e estudadas as variantes genéticas que se associavam ao aparecimento de HTA.

#### **V.1.6. Estudo genético no aparecimento de lesões dos órgãos alvo nos hipertensos**

Da coorte hipertensiva inicial n=860, foram perdidos 260 doentes no seguimento, permanecendo uma coorte de 600 doentes hipertensos, onde foram avaliadas as lesões dos órgãos alvo (LOA).

##### **Insuficiência Renal**

Insuficiência renal (n=545, doentes investigados, por terem sido excluídos os diabéticos)

##### **Retinopatia hipertensiva**

Retinopatia hipertensiva (n=600, doentes investigados)

##### **Cardiopatia hipertensiva**

Cardiopatia hipertensiva (n=600, doentes investigados)

##### **Doença vascular cerebral**

Doença vascular cerebral; AVC/AIT (n=24, doentes investigados)

Especificamente, para cada patologia investigada, foi constituído o grupo que apresentava LOA e o grupo sem LOA e em seguida, através de um estudo caso-controlo determinadas as variantes genéticas que se associavam ao aparecimento dessas Lesões de Órgão Alvo.

Em relação à Insuficiência Renal a amostra com LOA foi reduzida para 545 doentes hipertensos, em virtude de terem sido excluídos os diabéticos.

No respeitante à Retinopatia Hipertensiva a amostra com LOA apresentava 600 hipertensos.



Na Cardiopatia Hipertensiva esta amostra com LOA apresentava 600 indivíduos (juntando os electrocardiogramas com os ecocardiogramas).

Em relação à Doença Vascular Cerebral (AVC ou AIT), não foi possível fazer um estudo caso-controlo, em virtude da dimensão da amostra (n=24) não o permitir de forma confiável.

### **Fatores preditores de lesões nos órgãos alvo**

Na sequência do estudo anterior, foi criado um novo subgrupo de doentes resultante da junção daqueles que apresentavam pelo menos uma LOA em qualquer um destes sistemas; insuficiência renal e/ou retinopatia hipertensiva e/ou miocardiopatia hipertensiva e/ou doença vascular cerebral (n=330) que foi comparado, por estudo univariado, com outro grupo, sem qualquer LOA (n=270).

Efetuuou-se no mesmo grupo, o estudo multivariado dos fatores genéticos e ambientais que se associam ao aparecimento de pelo menos uma LOA, tendo aqui entrado como fatores de risco para LOA, além dos genéticos investigados, a idade, o género, HTA controlada e o tempo de diagnóstico.

### **Interação das variantes genéticas que se associaram ao aparecimento de LOA e dos fatores de risco não genéticos de LOA**

Por fim, estudámos com recurso ao *Data mining* (MDR), a interação das variantes genéticas que na análise univariada se associaram ao aparecimento de LOA e os fatores preditores não genéticos, no aparecimento de lesões de órgão alvo.

#### **V.1.7. Distribuição do número de alelos de risco nos casos e controlos**

Avaliámos na nossa população a distribuição do número de alelos de risco, nos grupos dos hipertensos e nos controlos.

#### **V.1.8. Construção de um *score* de risco genético para Hipertensão Arterial**

##### **V.1.8.1. Modelos de *score* genético**

Com as variantes genéticas estudadas procedeu-se à elaboração de dois *Scores* de risco Genéticos nos modelos aditivo (SRGa) e multiplicativo (SRGm), no grupo dos doentes hipertensos e nos controlos. Em seguida os seus valores foram divididos em quartis, para cada grupo estudado. Foi efetuada a distribuição dos dois modelos de *Score* pela mediana.

##### **V.1.8.2. Comparação dos dois *scores***

Avaliou-se a sensibilidade e especificidade dos dois modelos de *Score*, tendo sido escolhido o melhor modelo como preditor de HTA. O modelo mais sensível e específico foi o modelo multiplicativo (SRGm).

##### **V.1.8.3. Valor preditivo do *score* genético**

O poder de associação com a HTA do SRGm e dos Fatores ambientais (FRA) foi avaliado através de duas curvas ROC. Posteriormente estas foram comparadas, a fim de estimar o valor preditivo adicional de HTA do SRGm em relação aos fatores de risco ambientais.

##### **V.1.8.4. *Score* genético multiplicativo consoante o género**

A análise descrita anteriormente foi estimada para os dois géneros.

## **V.2. Ordem de apresentação dos resultados**

Os resultados do nosso estudo serão apresentados em tabelas e figuras, pela seguinte ordem:

### **V.2.1. Caracterização da população**

#### **Caraterísticas Demográficas, Clínicas e Bioquímicas**

A Tabela 4 apresenta as caraterísticas demográficas e clínicas verificadas no exame objetivo e a Tabela 5 representa os parâmetros bioquímico-laboratoriais. Ambas referem a população total, população hipertensa e população controlo, com comparação entre estes dois últimos grupos.

### **V.2.2. Variantes genéticas estudadas**

Apresentam-se os resultados obtidos em relação às variantes genéticas estudadas. A Tabela 6 revela a frequência das variantes genéticas estudadas no grupo dos casos e controlos assim como a significância entre eles. Na Tabela 7 e Figura 9 constam os resultados da análise gene a gene, de acordo com os diferentes modelos genéticos no risco de HTA, sendo que a citada figura inclui o melhor modelo para cada gene.

A Tabela 8 salienta a localização genética, frequência na população, frequência do alelo menor, significância do EHW e poder de associação com HTA na nossa população e na literatura.

Na Figura 10 demonstramos que a capacidade preditiva de HTA aumenta na medida em que se associam um maior número de variantes genéticas. Nesta figura aparece o valor discriminativo individual e o valor respeitante à associação de 5 variantes genéticas significativas. A Figura 11 representa a capacidade preditiva de HTA de um modelo com

as 13 variantes genéticas estudadas e em que se adicionou de forma progressiva cada variante, consoante o valor do seu OR e da sua significância (valor p).

Finalmente na Tabela 9 está representado o estudo genético multivariado.

### **V.2.3. Fatores de risco ambientais estudados**

Na Tabela 10 expomos os fatores de risco clássico de HTA em estudo multivariado.

### **V.2.4. Estudo combinado dos fatores de risco não genéticos e genéticos**

#### **V.2.4.1. Estudo multivariado**

Na Tabela 11 referimos o estudo multivariado dos fatores de risco genético e ambiental.

##### **V.2.4.1.1 Capacidade Preditiva da junção dos Fatores Genéticos e Ambientais**

Na Figura 12 e Tabela 12 demostramos que houve um aumento significativo no poder preditivo de HTA quando aos fatores tradicionais se associaram as cinco variantes genéticas que haviam mostrado significância na análise multivariada.

#### **V.2.4.2. Interação gene-gene**

Na Tabela 13 está representado o melhor modelo de interação das 13 variantes com recurso ao MDR. A Figura 13 representa o dendograma desta interação.

#### **V.2.4.3. Interação gene-ambiente**

A Tabela 14 e a Figura 14 exemplificam as interações Gene-Ambiente, obtidas pelo modelo de *machine learning*, com recurso ao *software* MDR, para avaliar a interação G-A, das 5 variantes genéticas consideradas significativas na análise gene a gene e os fatores ambientais, que se associaram ao aparecimento de HTA na análise de regressão logística.

### **V.2.5. Estudo genético em subgrupos – Género, Diabéticos, Obesos e Consumo de Sal**

Variantes genéticas que se associaram à HTA, nos seguintes subgrupos:

#### **Género Masculino**

Análise Univariada (Tabela 15 e Tabela 16)

Análise Multivariada (Tabela 17)

#### **Género Feminino**

Análise Univariada (Tabela 18 e Tabela 19)

Análise Multivariada (Tabela 20)

#### **Diabéticos**

Análise Univariada (Tabela 21 e Tabela 22)

Análise Multivariada (Tabela 23)

#### **Obesos**

Análise Univariada

Análise Multivariada

#### **Consumo de sal**

Avaliado o consumo de sal através da excreção urinária do Sódio (Tabela 24)

##### **Maior consumo de sal**

Análise Univariada

Análise Multivariada

##### **Menor consumo de sal**

Análise Univariada (Tabela 25 e Tabela 26)

Análise Multivariada (Tabela 27)

## **V.2.6. Estudo genético no aparecimento de lesões dos órgãos alvo nos Hipertensos**

### **Insuficiência Renal**

A Tabela 28 apresenta o número de indivíduos com Insuficiência renal/Lesão renal e a sua gravidade.

As Tabela 29, Tabela 30 e Tabela 31 (análise univariada e multivariada) demonstram as variantes genéticas que se associaram ao aparecimento de insuficiência renal no grupo de hipertensos.

### **Retinopatia Hipertensiva**

Não foi identificada nenhuma variante genética que se associe ao aparecimento de retinopatia hipertensiva.

### **Cardiopatía Hipertensiva**

A Tabela 32 apresenta o número de hipertensos com ecocardiograma/doppler cardíaco alterado e o número de pacientes que apresentavam critérios de Hipertrofia ventricular esquerda (HVE) no electrocardiograma.

A Tabela 33, Tabela 34 e Tabela 35 (análise univariada e multivariada) demonstram as variantes genéticas que se associaram ao aparecimento de cardiopatía hipertensiva no grupo dos hipertensos.

### **Doença Vascular Cerebral**

Em relação à doença vascular cerebral (AVC ou AIT), não foi possível fazer um estudo caso/controlo como anteriormente já foi referenciado.

## **Fatores genéticos e não genéticos preditivos de aparecimento de lesões de órgãos alvo**

### **Análise Univariada**

Fatores de risco ambientais (Tabela 36)

Fatores de risco genéticos (Tabela 37 e Tabela 38)

### **Análise Multivariada**

Fatores de risco ambientais (Tabela 39)

Fatores de risco genéticos (Tabela 40)

## **Análise combinada de fatores genéticos e não genéticos associados ao aparecimento de lesões nos órgãos alvo em hipertensos**

Análise multivariada dos fatores genéticos e não genéticos (Tabela 41).

Poder preditivo adicional com a junção das variantes genéticas significativas na análise multivariada aos fatores de risco para LOA (Figura 15 e Tabela 42).

Esta Tabela 42 pretende realçar o fato de que a junção das variantes genéticas significativas ao modelo elaborado apenas com os fatores não genéticos preditores de LOA só melhora a especificidade do mesmo e não apresenta significância estatística.

## **Modelos de interação entre fatores genéticos e não genéticos preditivos de lesões de órgãos alvo**

Melhor modelo (Tabela 43)

Dendrograma (Figura 16)

## **V.2.7. Construção de um score de risco genético preditivo de Hipertensão Arterial**

### **V.2.7.1. Distribuição do número de alelos de risco nos casos e controles**

A Figura 17 apresenta a distribuição dos alelos de risco entre os casos e os controles e a sua associação com o aparecimento de HTA (OR).

### **V.2.7.2. Score de risco genético**

Modelo aditivo. A Figura 18, a Tabela 44 e a Tabela 45 apresentam uma descrição do score de risco genético aditivo em quartis na população de casos e controles.

Modelo multiplicativo. Na Figura 19, na Tabela 46 e na Tabela 47 foi usada a mesma metodologia de análise que a adotada anteriormente.

Distribuição dos dois scores por medianas (Figura 20 e Figura 21).

### **V.2.7.3. Comparação dos dois scores – aditivo e multiplicativo**

A Tabela 48 apresenta o risco dos dois scores associados ao aparecimento de HTA.

A Figura 22 e a Tabela 49 mostram a capacidade preditiva para cada um dos scores através de duas curvas ROC.

### **V.2.7.4. Valor preditivo do score genético**

#### **Capacidade preditiva adicional do SRGm em relação aos fatores tradicionais**

Análise Multivariada (Tabela 50)

Capacidade preditiva do modelo com o SRGm e os FRT (Figura 23 e Tabela 51)



### **Estudo do SRGm consoante o género**

Distribuição do score genético multiplicativo de acordo com o género (Figura 24 e Tabela 52).

### **Valor preditivo adicional do score genético em relação aos fatores de risco de HTA no género masculino**

A Tabela 53 apresenta a análise multivariada combinando os fatores tradicionais com o SRGm no género masculino.

Capacidade preditiva do modelo com o SRGm e os FRT (Figura 25 e Tabela 54).

### **Valor preditivo adicional do score genético em relação aos fatores de risco de HTA no género feminino**

A Tabela 55 apresenta a análise multivariada combinando os fatores tradicionais com o SRGm no género feminino.

Capacidade preditiva do modelo com o SRGm e os FRT (Figura 26 e Tabela 56).

### **V.3. Apresentação dos resultados**

#### **V.3.1. Caracterização da população**

A Tabela 4 expõe as características da população em estudo, ajustada por sexo e idade.

Como já foi mencionado foram estudados 1712 indivíduos, existindo um predomínio do género masculino (51%). Esta tabela apresenta a prevalência dos fatores de risco convencionais de doença cardiovascular (DCV) na população de casos e controlos. No grupo de hipertensos, havia maior prevalência dos principais fatores de risco vascular, nomeadamente sedentarismo (56,3%), hábitos alcoólicos abusivos (34,1%), obesidade (38,5%), perímetro abdominal elevado (83,6%), razão cintura/anca elevada (93,1%), diabetes (19%), Dislipidémia (86,9%), velocidade de onda de pulso (VOP) elevada  $> 10 \text{ m/s}^2$  (14,1%), em relação ao grupo dos controlos e com significância estatística.

Em relação ao Tabagismo denota-se que o grupo de hipertensos tinha menor percentagem de indivíduos com hábitos tabágicos (19,7%), do que o grupo dos controlos (26,2%), provavelmente pelo fato dos indivíduos hipertensos, já estarem a ser seguidos em consultas médicas e em abordagem geral do risco cardiovascular, muitos deixaram de fumar.

**Tabela 4 – Características basais da população**

| Variáveis                                 | Total<br>(n=1712) | Hipertensos<br>(n=860) | Controlos<br>(n=852) | Valor p           |
|---|-------------------|------------------------|----------------------|-------------------|
| Idade, anos                               | 51 ± 7,9          | 51,4 ± 8               | 50,7 ± 7,7           | 0,069             |
| Sexo masculino, n (%)                     | 873 (51)          | 458 (53,3)             | 415 (48,7)           | 0,060             |
| Sedentarismo, n (%)                       | 915 (53,4)        | 484 (56,3)             | 431 (50,6)           | <b>0,018</b>      |
| Abuso álcool <sup>o</sup> , n (%)         | 540 (31,5)        | 293 (34,1)             | 247 (29)             | <b>0,024</b>      |
| Álcool, gr/dia                            | 0 (17 – 425)      | 0 (17,3 – 425)         | 0 (14,3 – 212,5)     | <b>&lt;0,0001</b> |
| Tabagismo, n (%)                          | 392 (22,9)        | 169 (19,7)             | 223 (26,2)           | <b>0,001</b>      |
| 1 a 10 cig./dia, n (%)                    | 144 (37,4)        | 59 (35,1)              | 85 (39,2)            | <b>0,004</b>      |
| 10 a 20 cig./dia, n (%)                   | 120 (31,2)        | 42 (25)                | 78 (35,9)            |                   |
| >20 cig./dia, n (%)                       | 121 (31,4)        | 67 (39,9)              | 54 (24,9)            |                   |
| IMC, kg/m <sup>2</sup>                    | 27,7 ± 4,8        | 29,1 ± 5,2             | 26,2 ± 4             | <b>&lt;0,0001</b> |
| IMC > 25 kg/m <sup>2</sup> , n (%)        | 1231 (71,9)       | 715 (83,2)             | 516 (60,6)           | <b>&lt;0,0001</b> |
| Obesidade**, n (%)                        | 458 (26,7)        | 331 (38,5)             | 127 (14,9)           | <b>&lt;0,0001</b> |
| Perímetro abdominal <sup>†</sup> , n (%)  | 1275 (74,5)       | 718 (83,6)             | 557 (65,4)           | <b>&lt;0,0001</b> |
| Cintura/anca elevada <sup>o</sup> , n (%) | 1527 (89,2)       | 800 (93,1)             | 727 (85,3)           | <b>&lt;0,0001</b> |
| Diabetes, n (%)                           | 203 (11,9)        | 163 (19)               | 40 (4,7)             | <b>&lt;0,0001</b> |
| Dislipidemia, n (%)                       | 1411 (82,4)       | 747 (86,9)             | 664 (77,9)           | <b>&lt;0,0001</b> |
| PAS, mmHg                                 | 134,1 ± 20,5      | 147,5 ± 19             | 120,7 ± 11           | <b>&lt;0,0001</b> |
| PAD, mmHg                                 | 84,2 ± 12,2       | 91 ± 11,9              | 77,2 ± 7,9           | <b>&lt;0,0001</b> |
| VOP, m/s <sup>2</sup>                     | 8 ± 1,5           | 8,4 ± 1,6              | 7,6 ± 1,3            | <b>&lt;0,0001</b> |
| VOP > 10 m/s <sup>2</sup> , n (%)         | 155 (9,1)         | 121 (14,1)             | 34 (4)               | <b>&lt;0,0001</b> |
| FC, bat./min                              | 72 ± 11,7         | 72,9 ± 12,2            | 71 ± 11,1            | <b>0,001</b>      |
| Eventos CV, n (%)                         | 49 (2,9)          | 40 (4,7)               | 9 (1,1)              | <b>&lt;0,0001</b> |
| CV familiar, n (%)                        | 553 (32,3)        | 331 (38,5)             | 222 (26,1)           | <b>&lt;0,0001</b> |
| HTA familiar, n (%)                       | 626 (36,6)        | 408 (47,5)             | 218 (25,6)           | <b>&lt;0,0001</b> |

IMC – Índice de massa corporal; PAS – Pressão arterial sistólica; PAD – Pressão arterial diastólica; FC – Frequência cardíaca; SRGA – Score de risco genético aditivo; SRGM – Score de risco genético multiplicativo; <sup>o</sup> >20gr/dia para os homens e >10gr/dia para as mulheres; \*\*IMC > 30kg/m<sup>2</sup>; <sup>†</sup> > 94cm para os homens e >80cm para as mulheres; <sup>o</sup> > 0,9 para os homens e > 0,8 para as mulheres; Valores contínuos expressos pela média±desvio padrão exceto o álcool que se apresenta pela mediana (Percentil 75 - máximo). Estatística significativa para valor p<0,05.

Como se pode verificar, quando se estratificam os fumadores pelo nº de cigarros por dia fumados, no grupo dos Hipertensos, havia menor percentagem de indivíduos que fumavam (1 a 10 cigarros por dia e 11 a 20 cigarros por dia) do que nos controlos. De forma diferente, no grupo dos hipertensos, havia maior percentagem de indivíduos com maior consumo tabágico (> 20 cigarros /dia) do que no grupo dos controlos, obtendo-se significado estatístico. Isto quer dizer que a nossa população hipertensa tem menos indivíduos a fumar, mas os que o fazem, fumam em quantidade superior.

Salienta-se também que o grupo dos Hipertensos tem valores médios de PAS e de PAD mais elevados do que no grupo dos controlos e com significância estatística (p<0,0001). É previsível o fato do grupo dos Hipertensos apresentar valores médios PAS e PAD mais elevados do que no grupo dos controlos, nomeadamente porque os nossos hipertensos

não apresentam um bom controlo tensional. Salienta-se que 103 (12%) dos nossos hipertensos não têm HTA controlada.

Em relação à história familiar de doença cardiovascular, existiam mais indivíduos com história familiar no grupo dos Hipertensos, 47,5% vs. 25,6% no grupo dos controlos.

Destaca-se que no grupo dos hipertensos 4,7% tinham História pessoal de Doença das artérias coronárias (DAC /EAM), 2,8% doença cerebrovascular (AVC/AIT) e no grupo dos controlos 1,1% tinham História pessoal de Doença das artérias coronárias (DAC/EAM), 1,1% de doença cerebrovascular (AVC/AIT).

## **FATORES BIOQUÍMICOS**

Destacamos que os indivíduos com HTA apresentam valores de leucócitos, Hemoglobina e Fibrinogénio mais elevados do que os controlos, mas têm valores mais baixos de Plaquetas, mas sem significância estatística.

Quanto ao perfil lipídico os Hipertensos apresentam um nível de colesterol total mais elevados, mas sem significância estatística. Mostram menores níveis séricos de HDL-C do que os controlos, com significância estatística ( $p < 0,0001$ ), assim como menores níveis de LDL-C, mas sem significância estatística. Os triglicéridos também têm valores séricos mais elevados no grupo dos Hipertensos em relação aos controlos e com significância estatística ( $p < 0,0001$ ). (Tabela 5)

**Tabela 5 – Características bioquímicas da população caso-controlo**

| Variáveis                       | Total<br>(n=1712)  | Hipertensos<br>(n=860) | Controlos<br>(n=852) | Valor p           |
|---------------------------------|--------------------|------------------------|----------------------|-------------------|
| Hemoglobina, g/dl               | 14,2 (9,6-18,2)    | 14,4 (9,6-18,2)        | 14,2 (10,1-17,6)     | <b>&lt;0,0001</b> |
| Plaquetas, 10 <sup>3</sup> /μl  | 229 (23-664)       | 233 (23-664)           | 228 (65-544)         | 0,099             |
| Leucócitos, 10 <sup>3</sup> /μl | 6,4 (2,1-16,6)     | 6,7 (2,9-14,8)         | 6,3 (2,1-16,6)       | <b>&lt;0,0001</b> |
| Fibrinogénio, mg/dl             | 365 (179,2-874)    | 372,0 (179,2-874)      | 361 (197-688)        | <b>&lt;0,0001</b> |
| Colesterol, mg/dl               | 206 (100-370)      | 206,5 (100-346)        | 206 (107-370)        | 0,776             |
| HDL-C, mg/dl                    | 48 (17,2-111,7)    | 47 (17,2-104)          | 49 (20,8-111,7)      | <b>&lt;0,0001</b> |
| LDL-C, mg/dl                    | 129 (37,7-269)     | 128,4 (37,7-269)       | 130 (42-260)         | 0,082             |
| Triglicéridos, mg/dl            | 111 (21-1098)      | 122,5 (29-1098)        | 100 (21-688)         | <b>&lt;0,0001</b> |
| Ureia, mg/dl                    | 33 (5 - 125)       | 34 (5 - 125)           | 33 (10 - 61)         | <b>0,010</b>      |
| Creatinina, mg/dl               | 0,89 (0,40 – 7,84) | 0,90 (0,40 – 7,84)     | 0,88 (0,40 – 1,42)   | <b>0,009</b>      |
| PCR (as), mg/dl                 | 0,22 (0,01-19,62)  | 0,23 (0,02-19,62)      | 0,20 (0,01-18,51)    | <b>&lt;0,0001</b> |
| Glicose, mg/dl                  | 96 (66-364)        | 99 (70-360)            | 94 (66-364)          | <b>&lt;0,0001</b> |

*HDL – High density lipoprotein; LDL – Low density lipoprotein; PCR (as) – Proteína C reativa (alta sensibilidade); Valores contínuos expressos pela mediana (mínimo - máximo); Estatística significativa para valor  $p < 0,05$ .*

Apesar de termos mais indivíduos com dislipidémia no grupo dos Hipertensos do que no dos controlos, os hipertensos apresentam melhor perfil lipídico do que os controlos. Isto deve-se provavelmente ao fato de os primeiros estarem a ser seguidos em consulta médica e medicados para dislipidémia.

Os níveis de glicemia em jejum foram superiores no grupo dos hipertensos em relação aos controlos, mas no grupo dos Hipertensos havia maior número de diabéticos do que nos controlos, razão pela qual se justifica esta diferença.

A Proteína C Reativa (PCR) apresentou medianas superiores no grupo dos hipertensos em relação à dos controlos e com significado estatístico ( $p < 0,0001$ ), o que significa que os doentes com hipertensão arterial apresentam perfil inflamatório mais agressivo.

#### **Terapêutica efetuada na população caso-controlo**

- 1 Dos 860 hipertensos, 38 indivíduos (4,4%) não estavam medicados.
- 2 Dos 203 diabéticos, 22 (10,8%) não faziam nenhum antidiabético oral nem estavam insulinotratados.

### **V.3.2. Variantes genéticas estudadas**

A Tabela 6 mostra a frequência genotípica das variantes estudadas e seu poder de associação com a hipertensão arterial.

Dos 13 polimorfismos investigados apenas houve diferenças significativas nos genótipos do *ADD1* rs4961 e do *GNB3* rs5443, que se associaram com a HTA. O *ACE* rs4340 o *ACE* 2350 rs4343 e o *ADRB1* rs1801253, mostram uma tendência, mas não atingem significância estatística.

**Tabela 6 – Frequência genotípica e Associação com Hipertensão Arterial**

| Genes                     | Genótipos | Casos<br>(n=860) | Controles<br>(n=852) | Valor p      |
|---------------------------|-----------|------------------|----------------------|--------------|
| <i>ACE</i> rs4340         | II        | 110 (12,8%)      | 128 (15,0%)          | 0,083        |
|                           | ID        | 368 (42,8%)      | 389 (45,7%)          |              |
|                           | DD        | 382 (44,4%)      | 335 (39,3%)          |              |
| <i>ACE</i> 2350 rs4343    | AA        | 143 (16,6%)      | 167 (19,6%)          | 0,068        |
|                           | AG        | 424 (49,3%)      | 435 (51,1%)          |              |
|                           | GG        | 293 (34,1%)      | 250 (29,3%)          |              |
| <i>AGT174</i> rs4762      | TT        | 676 (78,6%)      | 696 (81,7%)          | 0,255        |
|                           | TM        | 172 (20,0%)      | 144 (16,9%)          |              |
|                           | MM        | 12 (1,4%)        | 12 (1,4%)            |              |
| <i>AGT235</i> rs699       | MM        | 280 (32,6%)      | 295 (34,6%)          | 0,623        |
|                           | MT        | 421 (49,0%)      | 399 (46,8%)          |              |
|                           | TT        | 159 (18,5%)      | 158 (18,5%)          |              |
| <i>AT1R</i> rs5186        | AA        | 465 (51,1%)      | 489 (57,4%)          | 0,381        |
|                           | AC        | 345 (40,1%)      | 316 (37,1%)          |              |
|                           | CC        | 50 (5,8%)        | 47 (5,5%)            |              |
| <i>ADRB1</i> rs1801253    | GG        | 75 (8,7%)        | 101 (11,9%)          | 0,085        |
|                           | RG        | 379 (44,1%)      | 351 (41,2%)          |              |
|                           | RR        | 406 (47,2%)      | 400 (46,9%)          |              |
| <i>ADRB2</i> rs1042713    | RR        | 172 (20,0%)      | 152 (17,8%)          | 0,438        |
|                           | RG        | 406 (47,2%)      | 424 (49,8%)          |              |
|                           | GG        | 282 (32,8%)      | 276 (32,4%)          |              |
| <i>ADD1</i> rs4961        | GG        | 600 (69,8%)      | 617 (72,4%)          | <b>0,011</b> |
|                           | GT        | 230 (26,7%)      | 224 (26,3%)          |              |
|                           | TT        | 30 (3,5%)        | 11 (1,3%)            |              |
| <i>CYP11B2</i> rs1799998  | CC        | 169 (19,7%)      | 165 (19,4%)          | 0,486        |
|                           | CT        | 418 (48,6%)      | 437 (51,3%)          |              |
|                           | TT        | 273 (31,7%)      | 250 (29,3%)          |              |
| <i>CYP17A1</i> rs11191548 | TT        | 685 (79,7%)      | 685 (80,4%)          | 0,818        |
|                           | CT        | 161 (18,7%)      | 156 (18,3%)          |              |
|                           | CC        | 14 (1,6%)        | 11 (1,3%)            |              |
| <i>GNB3</i> rs5443        | CC        | 286 (33,3%)      | 341 (40,0%)          | <b>0,009</b> |
|                           | CT        | 440 (51,2%)      | 378 (44,4%)          |              |
|                           | TT        | 134 (15,6%)      | 133 (15,6%)          |              |
| <i>SCNN1G</i> rs5718      | AA        | 181 (21,0%)      | 186 (21,8%)          | 0,850        |
|                           | AG        | 386 (44,9%)      | 386 (45,3%)          |              |
|                           | GG        | 293 (34,1%)      | 280 (32,9%)          |              |
| <i>ATP2B1</i> rs2681472   | AA        | 610 (70,9%)      | 619 (72,7%)          | 0,715        |
|                           | AG        | 225 (26,2%)      | 211 (24,8%)          |              |
|                           | GG        | 25 (2,9%)        | 22 (2,6%)            |              |

## ESTUDO GENÉTICO UNIVARIADO. MELHOR MODELO GENÉTICO

No presente estudo foram avaliadas as 13 variantes genéticas de acordo com 4 modelos genéticos (Dominante, Recessivo, Aditivo e Multiplicativo ou frequência alélica). Os resultados mostram que houve 5 variantes genéticas que se associaram à HTA, na nossa população e com significado estatístico (análise gene a gene): *ACE* rs4340, *ACE2350* rs4343, *ADRB1* rs1801253, *ADD1* rs4961 e *GNB3* rs5443 (Tabela 7).

No entanto nenhuma das 5 variantes genéticas teve força de associação com HTA em todos os modelos genéticos. Salienta-se o fato de 3 dessas variantes (*ACE* rs4340, *ACE2350* rs4343 e *GNB3* rs5443) terem força de associação com a HTA em 3 modelos testados. Nas outras duas variantes genéticas (*ADRB1* rs1801253 e *ADD1* rs4961) a associação com HTA manteve-se em 1 modelo genético.

Quanto às restantes variantes genéticas não houve associação com o aparecimento de HTA, em nenhum dos modelos estudados.

Curiosamente, na nossa população, as variantes genéticas associadas à HTA, de forma significativa, têm diferentes mecanismos fisiopatológicos, o que poderá indicar que a etiologia da HTA, na nossa população, se deve a vários mecanismos fisiopatológicos. Isto não invalida que em outros estudos, com outras populações, haja um mecanismo fisiopatológico predominante, que se pode sobrepor aos outros e tornar evidente a sua influência na etiologia da HTA.

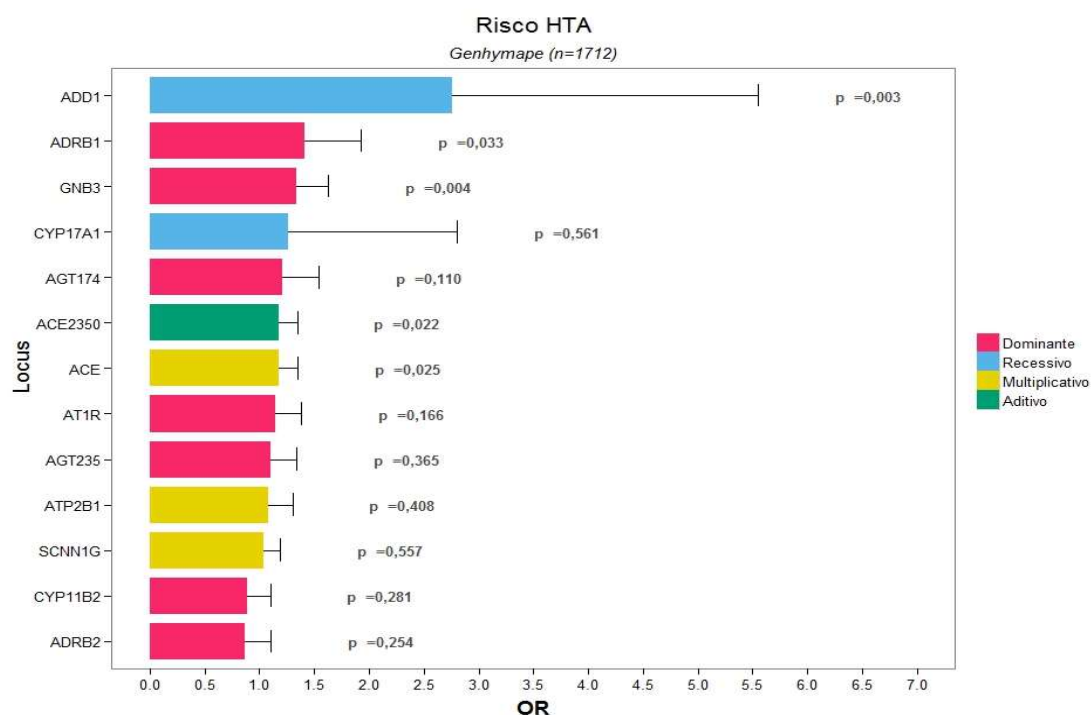


**Tabela 7 – Análise Univariada das variantes genéticas consoante os diferentes modelos genéticos**

| Genes              | Modelo         | Método           | Odds ratio (IC 95%)          | Valor p      |
|--------------------|----------------|------------------|------------------------------|--------------|
| ACE rs4340         | Dominante      | (DD+ID) vs. II   | 1,205 (0,916-1,586)          | 0,182        |
|                    | Recessivo      | DD vs. (II+ID)   | <b>1,233 (1,018-1,495)</b>   | <b>0,032</b> |
|                    | Aditivo        | DD vs. ID vs. II | <b>1,166 (1,016-1,337)</b>   | <b>0,029</b> |
|                    | Multiplicativo | D vs. I          | <b>1,173 (1,020-1,348)</b>   | <b>0,025</b> |
| ACE2350 rs4343     | Dominante      | (GG+AG) vs. AA   | 1,222 (0,955-1,564)          | 0,110        |
|                    | Recessivo      | GG vs. (AG+AA)   | <b>1,244 (1,015-1,526)</b>   | <b>0,036</b> |
|                    | Aditivo        | GG vs. AG vs. AA | <b>1,175 (1,024-1,347)</b>   | <b>0,022</b> |
|                    | Multiplicativo | G vs. A          | <b>1,170 (1,022-1,340)</b>   | <b>0,023</b> |
| AGT174 rs4762      | Dominante      | (MM+TM) vs. TT   | 1,214 (0,957-1,541)          | 0,110        |
|                    | Recessivo      | MM vs. (TM+TT)   | 1,171 (0,944-1,452)          | 0,151        |
|                    | Aditivo        | MM vs. TM vs. TT | 0,991 (0,443-2,217)          | 0,982        |
|                    | Multiplicativo | M vs. T          | 1,176 (0,946-1,462)          | 0,145        |
| AGT235 rs699       | Dominante      | (TT+MT) vs. MM   | 1,097 (0,898-1,341)          | 0,365        |
|                    | Recessivo      | TT vs. (MT+MM)   | 0,996 (0,781-1,272)          | 0,976        |
|                    | Aditivo        | TT vs. MT vs. MM | 1,041 (0,910-1,191)          | 0,556        |
|                    | Multiplicativo | T vs. M          | 1,042 (0,910-1,193)          | 0,552        |
| AT1R rs5186        | Dominante      | (CC+AC) vs. AA   | 1,144 (0,946 - 1,385)        | 0,166        |
|                    | Recessivo      | CC vs. (AC+AA)   | 1,057 (0,702 - 1,593)        | 0,790        |
|                    | Aditivo        | CC vs. AC vs. AA | 1,105 (0,944 - 1,293)        | 0,214        |
|                    | Multiplicativo | C vs. A          | 1,102 (0,944 - 1,286)        | 0,221        |
| ADRB1 rs1801253    | Dominante      | (RR+GR) vs. GG   | <b>1,408 (1,027 - 1,929)</b> | <b>0,033</b> |
|                    | Recessivo      | RR vs. (GR+GG)   | 1,011 (0,836 - 1,222)        | 0,914        |
|                    | Aditivo        | RR vs. GR vs. GG | 1,081 (0,936 - 1,247)        | 0,289        |
|                    | Multiplicativo | R vs. G          | 1,082 (0,937 - 1,249)        | 0,285        |
| ADRB2 rs1042713    | Dominante      | (GG+RG) vs. RR   | 0,869 (0,682-1,107)          | 0,254        |
|                    | Recessivo      | GG vs. (RG+RR)   | 1,018 (0,832-1,246)          | 0,861        |
|                    | Aditivo        | GG vs. RG vs. RR | 0,965 (0,844-1,104)          | 0,605        |
|                    | Multiplicativo | G vs. R          | 0,965 (0,843-1,104)          | 0,603        |
| ADD1 rs4961        | Dominante      | (TT+GT) vs. GG   | 1,138 (0,923-1,402)          | 0,226        |
|                    | Recessivo      | TT vs. (GT+GG)   | <b>2,763 (1,376-5,551)</b>   | <b>0,003</b> |
|                    | Aditivo        | TT vs. GT vs. GG | 1,203 (0,999-1,448)          | 0,051        |
|                    | Multiplicativo | T vs. G          | 1,202 (0,999-1,446)          | 0,051        |
| CYP11B2 rs1799998  | Dominante      | (TT+CT) vs. CC   | 0,982 (0,773 - 1,247)        | 0,882        |
|                    | Recessivo      | TT vs. (CT+CC)   | 1,120 (0,912 - 1,376)        | 0,281        |
|                    | Aditivo        | TT vs. CT vs. CC | 1,044 (0,912 - 1,196)        | 0,531        |
|                    | Multiplicativo | T vs. C          | 1,044 (0,912 - 1,194)        | 0,533        |
| CYP17A1 rs11191548 | Dominante      | (CC+TC) vs. TT   | 1,048 (0,827 - 1,328)        | 0,699        |
|                    | Recessivo      | CC vs. (TC+TT)   | 1,265 (0,571 - 2,803)        | 0,561        |
|                    | Aditivo        | CC vs. TC vs. TT | 1,056 (0,854 - 1,308)        | 0,614        |
|                    | Multiplicativo | C vs. T          | 1,058 (0,852 - 1,314)        | 0,608        |
| GNB3 rs5443        | Dominante      | (TT+CT) vs. CC   | <b>1,339 (1,100-1,631)</b>   | <b>0,004</b> |
|                    | Recessivo      | TT vs. (CT+CC)   | 0,998 (0,769-1,296)          | 0,987        |
|                    | Aditivo        | TT vs. CT vs. CC | <b>1,152 (1,004-1,321)</b>   | <b>0,044</b> |
|                    | Multiplicativo | T vs. C          | <b>1,152 (1,004-1,321)</b>   | <b>0,044</b> |
| SCNN1G rs5718      | Dominante      | (GG+AG) vs. AA   | 1,048 (0,832 - 1,320)        | 0,693        |
|                    | Recessivo      | GG vs. (AG+AA)   | 1,056 (0,864 - 1,290)        | 0,597        |
|                    | Aditivo        | GG vs. AG vs. AA | 1,038 (0,912 - 1,182)        | 0,573        |
|                    | Multiplicativo | G vs. A          | 1,041 (0,910 - 1,192)        | 0,557        |
| ATP2B1 rs2681472   | Dominante      | (GG+AG) vs. AA   | 1,089 (0,882-1,344)          | 0,429        |
|                    | Recessivo      | GG vs. (AG+AA)   | 1,130 (0,632-2,019)          | 0,681        |
|                    | Aditivo        | GG vs. AG vs. AA | 1,079 (0,899-1,296)          | 0,414        |
|                    | Multiplicativo | G vs. A          | 1,081 (0,899-1,302)          | 0,408        |

IC – Intervalo de confiança; Estatisticamente significativo para  $p < 0,05$ .

Igualmente na Figura 9 podemos visualizar as diferentes variantes genéticas estudadas, consoante o melhor modelo genético, em relação ao risco de HTA. A variante genética *ADD1* rs4961 salienta-se, em relação às outras com um risco de HTA de 2,763, no modelo recessivo e com significância estatística ( $p=0,003$ ). Seguida da *ADRB1* rs1801253 (OR 1,408,  $p=0,033$ ) no modelo dominante, da *GNB3* rs5443 (OR 1,339,  $p=0,004$ ), no modelo dominante e por fim *ACE2350* rs4343 e *ACE* rs4340 com OR 1,244, ( $p=0,036$ ) e 1,233 ( $p=0,032$ ), respetivamente, no modelo recessivo. As outras variantes não tiveram significância estatística em nenhum dos modelos.



**Figura 9 – Variantes genéticas estudadas de acordo com o melhor modelo genético**

## Estudo global das Variantes Genéticas e suas associações

**Tabela 8 – Estudo das 14 variantes genéticas, posição no cromossoma, alelo de risco e a frequência do alelo *minor*. Poder da associação (OR) do genótipo e do alelo com a HTA.**

|                 |            |     |           | População total (n=1712) |           |                                     |            |            |                | OR<br>Literatura   |
|-----------------|------------|-----|-----------|--------------------------|-----------|-------------------------------------|------------|------------|----------------|--------------------|
| Gene            | SNP        | Cr. | Posição   | Frequência** (%)         |           | OR*<br>(IC 95%)                     | Valor<br>p | MAF<br>(%) | Valor<br>p HWE |                    |
|                 |            |     |           | Casos                    | Controlos |                                     |            |            |                |                    |
| ACE I/D         | rs4340     | 17  | 61565892  | 65,8                     | 62,1      | 1,17 (1,02 – 1,35) <sup>Δ</sup>     | 0,025      | 36         | 0,150          | 1,0 <sup>1</sup>   |
| ACE 2350 A/G    | rs4343     | 17  | 63488670  | 58,7                     | 54,9      | 1,18 (1,02 – 1,35) <sup>§</sup>     | 0,022      | 43,2       | 0,618          | 1,06 <sup>2</sup>  |
| AGT T/M (T174M) | rs4762     | 1   | 230710231 | 11,4                     | 9,9       | 1,21 (0,96 – 1,54) <sup>&amp;</sup> | 0,110      | 10,6       | 0,779          | 1,1 <sup>1</sup>   |
| AGT M/T (M235T) | rs699      | 1   | 230710048 | 43                       | 42        | 1,10 (0,90 – 1,34) <sup>&amp;</sup> | 0,365      | 42,5       | 0,973          | 1,20 <sup>3</sup>  |
| AT1R A/C        | rs5186     | 3   | 148742201 | 25,9                     | 24,1      | 1,14 (0,95 – 1,39) <sup>&amp;</sup> | 0,166      | 25         | 0,179          | 2,05 <sup>4</sup>  |
| CYP11B2 C/T     | rs1799998  | 8   | 142918184 | 56                       | 55        | 1,12 (0,91 – 1,38) <sup>#</sup>     | 0,281      | 44,5       | 0,693          | 1,03 <sup>5*</sup> |
| CYP17A1 T/C     | rs11191548 | 10  | 103086421 | 11                       | 10,4      | 1,27 (0,57 – 2,80) <sup>#</sup>     | 0,561      | 10,7       | 0,207          | 1,16 <sup>6</sup>  |
| ADD1 G/T        | rs4961     | 4   | 2904980   | 16,9                     | 14,4      | 2,76 (1,38 – 5,55) <sup>#</sup>     | 0,003      | 15,7       | 0,177          | 1,80 <sup>7</sup>  |
| GNB3 C/T        | rs5443     | 12  | 6845711   | 41,2                     | 37,8      | 1,34 (1,10 – 1,63) <sup>&amp;</sup> | 0,004      | 39,5       | 0,099          | 1,33 <sup>8</sup>  |
| ADRβ1 G/R       | rs1801253  | 10  | 114045297 | 69,2                     | 67,5      | 1,41 (1,03 – 1,93) <sup>&amp;</sup> | 0,033      | 31,6       | 0,309          | 1,65 <sup>9*</sup> |
| ADRβ2 R/G       | rs1042713  | 5   | 148826877 | 56,4                     | 57,3      | 1,02 (0,83 – 1,25) <sup>#</sup>     | 0,861      | 43,2       | 0,239          | 1,04 <sup>10</sup> |
| SCNN1G A/G      | rs5718     | 16  | 23182544  | 56,5                     | 55,5      | 1,04 (0,91 – 1,19) <sup>Δ</sup>     | 0,557      | 44         | 0,011          | –                  |
| SLC4A2 C/T      | rs2303934  | 7   | 150767540 | 3,7                      | 2,7       | 1,39 (0,95 – 2,05) <sup>Δ</sup>     | 0,090      | 3,2        | <0,0001        | 3,21 <sup>12</sup> |
| ATP2B1 A/G      | rs2681472  | 12  | 89615182  | 16                       | 15        | 1,08 (0,90 – 1,30) <sup>Δ</sup>     | 0,408      | 15,5       | 0,444          | 1,26 <sup>13</sup> |

\*\*Frequência do alelo de risco; Cr. – Cromossoma; \*OR - Odds Ratio do melhor modelo genético; #modelo recessivo; &modelo dominante; §modelo aditivo; Δmodelo multiplicativo; MAF – Minor allele frequency; HW - Hardy Weinberg tendo como  $p < 0,004$  após correção de Bonferroni

<sup>1</sup>(212) <sup>2</sup>(122) <sup>3</sup>(128) <sup>4</sup>(131) <sup>5</sup>(213) <sup>6</sup>(106) <sup>7</sup>(230) <sup>8</sup>(172) <sup>9</sup>(157) <sup>10</sup>(214) <sup>12</sup>(215) <sup>13</sup>(216)

A Tabela 8 apresenta o estudo das variantes genéticas investigadas nomeadamente o gene, a designação da base de dados SNP (rs), o poder de associação com HTA (OR) tanto na nossa população como o descrito na literatura, percentagem do alelo menor e significância do Equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (p).

O poder da associação (OR) com a HTA das variantes genéticas na nossa população é semelhante ao descrito na literatura, destacando-se a variante *ADD1* G/T cujo OR (2,763) é quase o dobro do descrito na literatura (1,80). O oposto sucede com as variantes genéticas, *AT1R* A/C e *SLC4A2* C/T cujos OR's descritos na literatura (2,05) e (3,21) são superiores aos da nossa população (1,144) e (1,393) respetivamente. Salienta-se o fato de 4 das variantes genéticas estudadas, (*ACE* 2350 A/G, *AGT* M/T (M235T), *CYP11B2* C/T, *ADRβ2* R/G e *SCNN1G* A/G apresentarem uma frequência do alelo menor

superior a 40%. Uma frequência do alelo menor inferior a 10, foi encontrada na variante genética *SLC4A2* C/T. Esta variante também se não encontrava em conformidade com o equilíbrio de Hardy-Weinberg e por isso não foi considerada no estudo.

#### CAPACIDADE PREDITIVA DE CADA VARIANTE INDIVIDUAL E DA JUNÇÃO DAS 5 VARIANTES SIGNIFICATIVAS

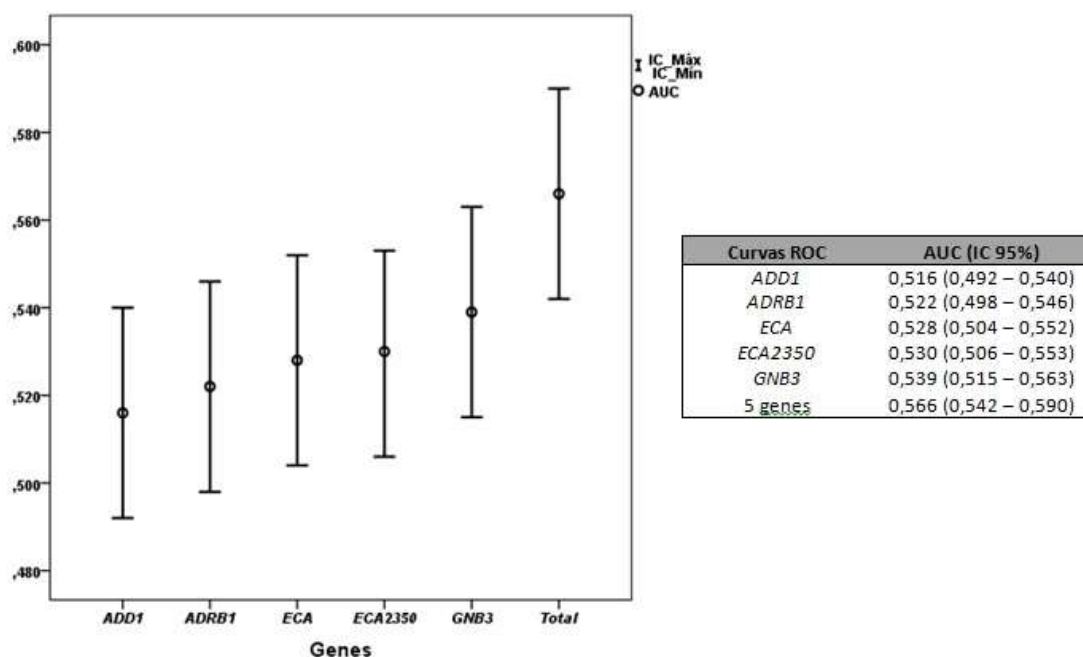


Figura 10 – Capacidade preditiva de HTA que aumenta à medida que se associam um maior número de variantes genéticas.

Demonstramos que a capacidade preditiva de HTA aumenta na medida em que se associam um maior número de variantes genéticas. Foi determinado o valor discriminativo individual e o respeitante à associação de 5 variantes genéticas significativas. Determinamos para cada polimorfismo associado com a HTA de forma significativa (análise univariada) o seu poder discriminativo, através de uma Curva ROC. Foi calculada a área sob a curva (AUC) e respetivo intervalo de confiança. Posteriormente foi usada a mesma metodologia para a junção das 5 variantes significativas, surgindo uma nova curva ROC onde também foi calculada a AUC. Como podemos observar o poder discriminativo da AUC para os 5 genes foi de 0,566 (IC a 95% de 0,542-0,590), sendo superior ao poder discriminativo de cada variante per si.

## CAPACIDADE PREDITIVA DE UM MODELO COM AS 13 VARIANTES GENÉTICAS

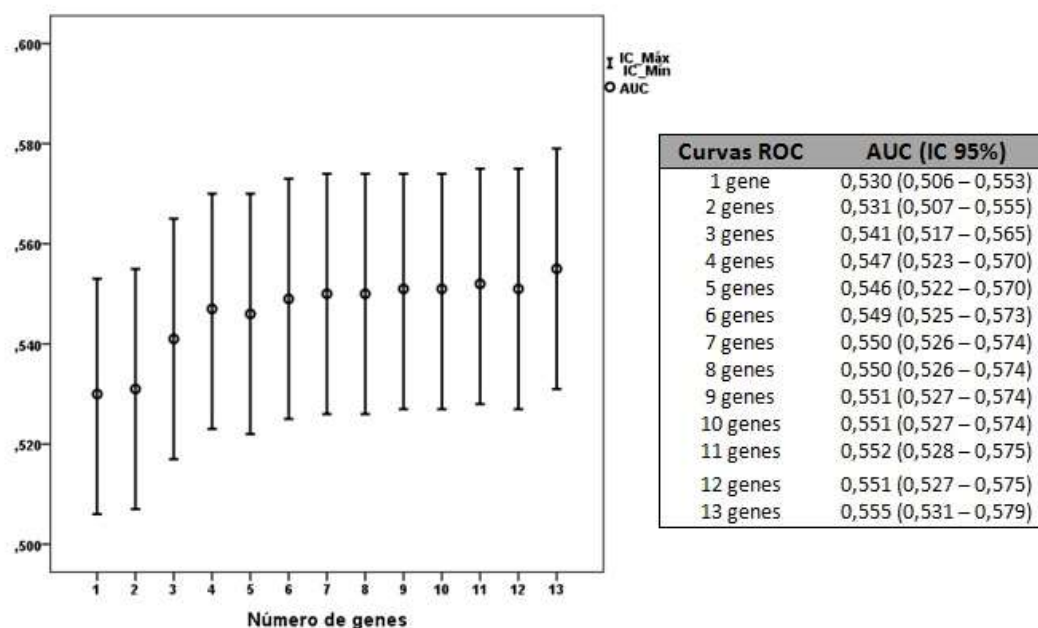


Figura 11 – Capacidade preditiva de HTA de um modelo com as 13 variantes genéticas

A Figura 11 representa a capacidade preditiva de HTA de um modelo com as 13 variantes genéticas estudadas e em que se adicionou de forma progressiva cada gene, consoante o valor do seu OR e da sua significância (valor p).

Através de uma Curva ROC, para cada gene, calculou-se a capacidade preditiva de HTA e foi obtida a respetiva área sob a curva. Usando como base o gene com maior capacidade preditiva e poder de associação com HTA, foram sendo adicionados, de forma sucessiva, os respetivos valores das AUC de cada gene de forma crescente. Foi possível assim estimar os incrementos encontrados na capacidade preditiva de HTA sempre que cada polimorfismo era associado.

Com a introdução dos primeiros quatro polimorfismos, apareceu um grande incremento na capacidade preditiva, em seguida ao 5º polimorfismo, também se manteve esse incremento, mas de forma menos acentuada.

## ESTUDO GENÉTICO MULTIVARIADO

**Tabela 9 – Estudo gene a gene multivariado: análise de regressão logística**

| Variáveis   | B      | E.P.  | Wald  | gl | Odds ratio (IC 95%)   | Valor p      |
|-------------|--------|-------|-------|----|-----------------------|--------------|
| <i>ADD1</i> | ----   | ----  | 8,075 | 2  | ----                  | <b>0,018</b> |
| GT          | 0,059  | 0,110 | 0,281 | 1  | 1,060 (0,854 – 1,316) | 0,596        |
| TT          | 1,011  | 0,358 | 7,987 | 1  | 2,750 (1,363 – 5,545) | <b>0,005</b> |
| <i>GNB3</i> | ----   | ----  | 9,073 | 2  | ----                  | <b>0,011</b> |
| CT          | 0,322  | 0,107 | 9,072 | 1  | 1,379 (1,119 – 1,701) | <b>0,003</b> |
| TT          | 0,179  | 0,147 | 1,490 | 1  | 1,196 (0,897 – 1,595) | 0,222        |
| Constante   | -0,210 | 0,086 | 5,975 | 1  | 0,810                 | <b>0,015</b> |

\*Método *Forward Wald* (SPSS vs. 19.0) em que saíram da equação as variantes genéticas: *ACE2350*, *CYP11B2*, *ADRB1*, *ADRB2*, *AGT235*, *AT1R*, *ACE*, *SCNN1G*, *CYP17A1*, *ATP2B1*, *AGT174*. B – Coeficiente de Beta; E.P. – Erro padrão; gl – graus de liberdade; IC – Intervalo de confiança; IMC – Índice de massa corporal. Estatisticamente significativo para  $p < 0,05$ .

Na Tabela 9, mostramos o estudo multivariado das 13 variantes genéticas, no risco de HTA.

Foi realizada uma análise multivariada por regressão logística com todas as variantes genéticas estudadas para determinar aquelas que são preditores genéticos de HTA. As que permaneceram na equação e que se associaram de forma significativa e independente com a HTA foram: *ADD1* TT (OR 2,750;  $p=0,005$ ) e a *GNB3* CT (OR 1,379;  $p=0,003$ ), que são variantes genéticas que interferem no balanço de sódio e água.

Houve boa calibração do modelo da regressão logística, confirmado pelo teste de Hosmer-Lemeshow ( $p=0,980$ ).

As análises do ajuste e calibração do modelo multivariado cumpriram os pressupostos.

### V.3.3. Fatores de risco ambientais estudados

## ESTUDO DOS FACTORES DE RISCO NÃO GENÉTICOS DE HTA

**Tabela 10 – Fatores de risco não genéticos de HTA: análise de regressão logística**

| Variáveis    | B      | E.P.  | Wald    | gl | Odds ratio (IC 95%)   | Valor p           |
|--------------|--------|-------|---------|----|-----------------------|-------------------|
| Abuso álcool | 0,297  | 0,114 | 6,796   | 1  | 1,346 (1,076 – 1,682) | <b>0,009</b>      |
| Obesidade    | 1,103  | 0,125 | 77,805  | 1  | 3,014 (2,359 – 3,851) | <b>&lt;0,0001</b> |
| Diabetes     | 1,405  | 0,193 | 52,876  | 1  | 4,075 (2,791 – 5,951) | <b>&lt;0,0001</b> |
| HTA familiar | 1,017  | 0,111 | 84,419  | 1  | 2,764 (2,225 – 3,433) | <b>&lt;0,0001</b> |
| Constante    | -0,875 | 0,084 | 108,872 | 1  | 0,417                 | <b>&lt;0,0001</b> |

\*Método *Forward Wald* (SPSS vs. 19.0) em que saiu da equação a variável *Sedentarismo*. B – Coeficiente de Beta; E.P. – Erro padrão; gl – graus de liberdade; IC – Intervalo de confiança. Estatisticamente significativo para  $p < 0,05$ .

Foram estudados os fatores de risco clássicos de HTA tais como a obesidade, diabetes, consumo de álcool e história familiar de HTA, a fim de avaliar quais destes são preditores independentes de HTA. Feita uma análise multivariada por regressão logística com estes fatores de risco os que permaneceram na equação foram o abuso de álcool (OR 1,346), obesidade (OR 3,014), diabetes (OR 4,075), e história familiar de HTA (OR 2,764), associando-se assim de forma significativa e independente com a HTA.

O sedentarismo saiu da equação não influenciando o aparecimento de HTA na nossa população (Tabela 10).

Outro fator de risco clássico de HTA, o tabagismo, não entrou na equação, pelo fato de provavelmente se poder gerar um viés, pois os controlos têm mais hábitos tabágicos do que os casos, como já foi referido.

Houve boa calibração do modelo da regressão logística, confirmado pelo teste de *Hosmer-Lemeshow* ( $p=0,115$ ).

As análises do ajuste e calibração do modelo multivariado cumpriram os pressupostos.

### V.3.4. Estudo combinado dos fatores de risco não genéticos e genéticos

#### V.3.4.1. Estudo multivariado

**Tabela 11 – Fatores de risco não genéticos e genéticos de HTA: análise de regressão logística**

| Variáveis    | B      | E.P.  | Wald   | gl | Odds ratio (IC 95%)   | Valor p           |
|--------------|--------|-------|--------|----|-----------------------|-------------------|
| Obesidade    | 1,102  | 0,126 | 76,757 | 1  | 3,011 (2,353 – 3,853) | <b>&lt;0,0001</b> |
| Diabetes     | 1,413  | 0,195 | 52,642 | 1  | 4,109 (2,805 – 6,019) | <b>&lt;0,0001</b> |
| HTA familiar | 1,003  | 0,111 | 86,067 | 1  | 2,809 (2,258 – 3,494) | <b>&lt;0,0001</b> |
| Abuso álcool | 0,308  | 0,114 | 7,272  | 1  | 1,361 (1,088 – 1,703) | <b>0,007</b>      |
| ACE2350      |        |       | 6,687  | 2  |                       | <b>0,035</b>      |
| AG           | 0,246  | 0,145 | 2,861  | 1  | 1,279 (0,962 – 1,701) | 0,091             |
| GG           | 0,404  | 0,156 | 6,672  | 1  | 1,498 (1,102 – 2,036) | <b>0,010</b>      |
| ADD1         |        |       | 6,650  | 2  |                       | <b>0,036</b>      |
| GT           | 0,096  | 0,120 | 0,639  | 1  | 1,100 (0,870 – 1,391) | 0,424             |
| TT           | 0,952  | 0,379 | 6,300  | 1  | 2,592 (1,232 – 5,453) | <b>0,012</b>      |
| Constante    | -1,184 | 0,148 | 63,552 | 1  | 0,306                 | <b>&lt;0,0001</b> |

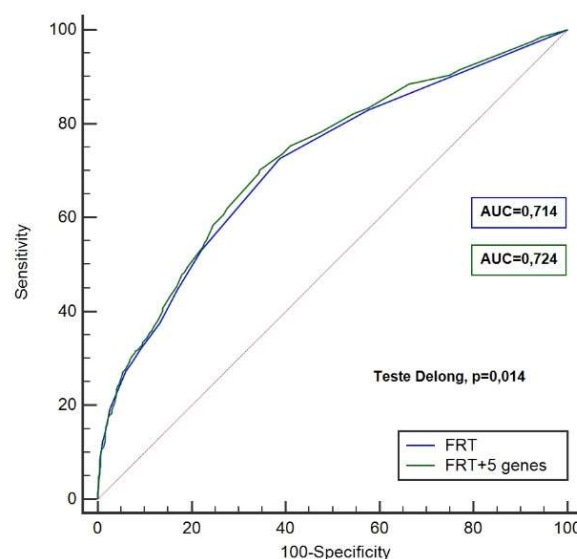
\*Método Forward Wald (SPSS vs. 19.0) em que saíram da equação as variáveis: Sedentarismo; genes GNB3; ADRB1 e ACE I/D. B – Coeficiente de Beta; E.P. – Erro padrão; gl – graus de liberdade; IC – Intervalo de confiança. Estatisticamente significativo para  $p<0,05$ .

Foi efetuado um estudo combinado por análise multivariada de regressão logística, com as variantes genéticas que na análise univariada se associaram com a HTA e com os fatores de risco clássicos de HTA, a fim de determinar quais as variáveis genéticas e não genéticas associadas à HTA, de forma significativa. As variáveis que permaneceram na equação foram, obesidade (OR 3,011), diabetes (OR 4,109), e história familiar de HTA (OR 2,809), abuso de álcool (OR 1,361), e as variantes genéticas foram *ACE2350* AG (OR 1,279) e GG (OR 1,498) e *ADD1* GT (OR 1,100) e TT (OR 2,592), associando-se de forma significativa e independente com a HTA (Tabela 11).

Houve boa calibração do modelo da regressão logística, confirmado pelo teste de *Hosmer-Lemeshow* ( $p=0,268$ ).

As análises do ajuste e calibração do modelo multivariado cumpriram os pressupostos.

#### VALOR PREDITIVO ADICIONAL DOS FATORES DE RISCO TRADICIONAIS E DESTES COM A JUNÇÃO DOS 5 POLIMORFISMOS SIGNIFICATIVOS



**Figura 12 – Comparação das Curvas de ROC e respetivas AUC para os fatores de risco tradicionais de HTA (FRT) e dos FRT + 5 genes.**

Procurámos também, avaliar o poder preditivo dos FRT de HTA e posteriormente compará-lo com o poder preditivo dos FRT quando são associados aos 5 polimorfismos, que na análise univariada se associavam com HTA (Figura 12).



Através da elaboração de uma primeira curva ROC apenas com os fatores tradicionais, foi calculada a sua AUC cujo valor foi = 0,714. Em seguida foi feita nova curva ROC, com os FRT associados aos 5 genes significativos, cuja área sob a curva foi de 0,724. A fim de avaliar o poder preditivo adicional conferido por esta segunda curva, em relação à primeira, foi efetuado o Teste de Delong, que comparou as duas curvas. Este mostrou que existia diferença, com significância estatística ( $p=0,014$ ), entre as duas curvas.

**Tabela 12 – Curvas ROC e respectivas AUC para os fatores de risco tradicionais de HTA (FRT) e dos FRT + 5 genes.**

| Modelos       | AUC<br>(IC 95%)       | Sensib.<br>(%) | Especif.<br>(%) | VPP  | VPN  | Teste<br>Delong<br>(p) |
|---------------|-----------------------|----------------|-----------------|------|------|------------------------|
| FRT           | 0,714 (0,692 – 0,736) | 72,7           | 61,3            | 1,88 | 0,45 | <b>0,014</b>           |
| FRT + 5 genes | 0,724 (0,702 – 0,745) | 70,2           | 65,5            | 2,04 | 0,45 |                        |

*FRT – Fatores de risco tradicionais; AUC – Area under the curve; IC – Intervalo de confiança; Sensib. – Sensibilidade; Especif. – Especificidade; VPP – Valor preditivo positivo; VPN – Valor preditivo negativo; estatisticamente significativo para  $p<0,05$ .*

Quando são associados aos FRT de HTA os polimorfismos que na análise univariada se associaram ao aparecimento de HTA (Tabela 12), aumenta o poder preditivo do modelo, à custa de uma redução da sensibilidade (de 72,7% para 70,2%) mas a melhoria de especificidade (de 61,3% para 65,5%). O valor preditivo positivo aumentou de 1,88 para 2,04 ao adicionarmos os polimorfismos permanecendo igual o valor preditivo negativo (0,45). No global, o modelo final (FRT + 5 genes) apresenta uma área sob a curva de 0,724, com significância estatística ( $p=0,014$ ).

### V.3.4.2. Interação gene-gene

Tabela 13 – Modelos de interação Gene-Gene por MDR

| Melhores modelos                     | Treino             |                       |                   | Teste              |                       |         | Consistência VC |
|--------------------------------------|--------------------|-----------------------|-------------------|--------------------|-----------------------|---------|-----------------|
|                                      | Acurácia ponderada | Odds ratio (IC 95%)   | Valor p           | Acurácia ponderada | Odds ratio (IC 95%)   | Valor p |                 |
| <i>GNB3</i>                          | 0,535              | 1,33<br>(1,09 – 1,62) | <b>0,006</b>      | 0,523              | 1,21<br>(0,66 – 2,20) | 0,543   | 10/10           |
| <i>ADRB1; GNB3</i>                   | 0,546              | 1,45<br>(1,18 – 1,77) | <b>0,0003</b>     | 0,497              | 0,98<br>(0,54 – 1,79) | 0,945   | 2/10            |
| <i>CYP11B2; ADRB1; GNB3</i>          | 0,566              | 1,70<br>(1,39 – 2,08) | <b>&lt;0,0001</b> | 0,503              | 1,03<br>(0,56 – 1,87) | 0,930   | 4/10            |
| <i>ACE2350; CYP11B2; ADRB1; GNB3</i> | 0,602              | 2,29<br>(1,87 – 2,81) | <b>&lt;0,0001</b> | 0,510              | 1,08<br>(0,59 – 1,98) | 0,792   | 5/10            |

MDR – Multifactor dimensionality reduction; VC – Validação cruzada; IC – Intervalo de confiança. Melhor modelo com 4 variáveis inclui as variantes *ACE2350; CYP11B2; ADRB1; GNB3*. Estatisticamente significativo para  $p < 0,05$ .

Com recurso à análise *data mining* (MDR), foram elaborados modelos de interação Gene-Gene, com todas as variantes genéticas estudadas, tendo como objetivo avaliar o melhor modelo de interação Gene-Gene, na previsão de HTA.

Verifica-se que o melhor modelo de interação entre as variantes genéticas foi o constituído por 4 variantes genéticas (*ACE2350; CYP11B2; ADRB1; GNB3*). No entanto, apresentou uma validação cruzada com pouca consistência de 5/10 e sem significância estatística ( $p=0,792$ ).

Na nossa análise não obtivemos nenhum modelo genético bem ajustado pois o valor de treino e de teste nunca são significativos (Tabela 13).

Isto leva-nos a concluir que não houve nenhum modelo preferencial de interação entre as variantes genéticas estudadas por MDR.

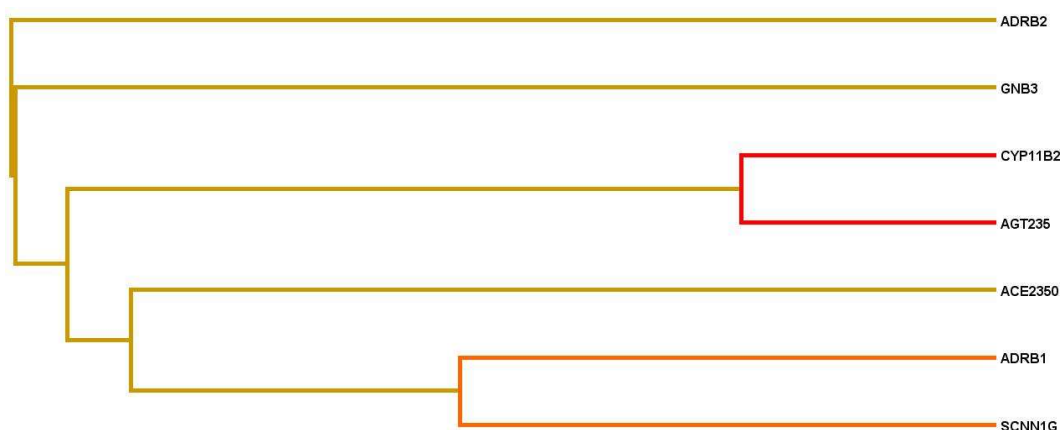


Figura 13 – Dendrograma de interações gene-gene das 13 variantes genéticas.

Recorrendo ao Diagrama de Entropia (Figura 13), podemos obter uma representação das interações genéticas (Epistasia), assim como da ausência de interação (Redundância).

Neste modelo houve uma interação epistática elevada entre o gene *AGT235* e o *CYP11B2* e moderada entre o *ADRB1* e o *SCNN1G*.

E as variáveis *ADRB2*, *GNB3* e *ACE2350* mostram inexistência de interação (Redundância).

#### V.3.4.3. Interação gene-ambiente

Tabela 14 – Melhor modelo de interação Gene-Ambiente por MDR

| Melhores modelos                                  | Treino             |                               |                   | Teste              |                               |                   | Consistência VC |
|---|--------------------|-------------------------------|-------------------|--------------------|-------------------------------|-------------------|-----------------|
|   | Acurácia ponderada | Odds ratio (IC 95%)           | Valor p           | Acurácia ponderada | Odds ratio (IC 95%)           | Valor p           |                 |
| Obesidade   | 0,618              | 3,57<br>(2,79 – 4,57)         | <0,0001           | 0,618              | 3,57<br>(1,71 – 7,47)         | 0,0005            | 10/10           |
| Obesidade; Diabetes                               | 0,639              | 3,78<br>(3,01 – 4,76)         | <0,0001           | 0,639              | 3,78<br>(1,90 – 7,56)         | 0,0001            | 10/10           |
| <b>Obesidade; Diabetes; ADD1</b>                  | <b>0,642</b>       | <b>3,79<br/>(3,02 – 4,76)</b> | <b>&lt;0,0001</b> | <b>0,642</b>       | <b>3,79<br/>(1,92 – 7,50)</b> | <b>&lt;0,0001</b> | <b>10/10</b>    |
| Sedentarismo; Obesidade; Diabetes; <i>ACE2350</i> | 0,646              | 3,63<br>(2,92 – 4,52)         | <0,0001           | 0,639              | 3,41<br>(1,77 – 6,54)         | 0,0002            | 9/10            |

MDR – Multifactor dimensionality reduction; VC – Validação cruzada; IC – Intervalo de confiança. Melhor modelo com 3 variáveis inclui as variáveis Obesidade, Diabetes e o gene *ADD1*. Estatisticamente significativo para  $p < 0,05$ .

Com recurso à análise *data mining* por MDR, foram feitos modelos de interação Gene-Ambiente, com as 5 variantes genéticas (*ACE I/D*, *ACE2350*, *ADD1*, *ADRB1*, *GNB3*, que na análise univariada se associavam à HTA) e os FRT ambientais: Obesidade, Diabetes, Sedentarismo e abuso de álcool, tendo como objetivo avaliar por MDR, o melhor modelo de interação Gene-Ambiente na predição de HTA.

Verificamos (Tabela 14 e Figura 14) que o melhor modelo de interação entre os fatores de risco ambientais e as 5 variantes genéticas, foi o que englobou a Obesidade, a Diabetes e o gene *ADD1*, com OR de 3,79 (IC a 95% 1,92-7,50) e com consistência de validação cruzada 10/10 ( $p < 0,0001$ ). Como o valor da acurácia para os dados de treino e de teste são adequados (64%) e a consistência 10/10, podemos considerar um bom modelo de interação.

O abuso de álcool não permaneceu em nenhum modelo de interação, assim como as variantes genéticas *ACE I/D*, *ACE2350*, *ADRB1* e *GNB3*.

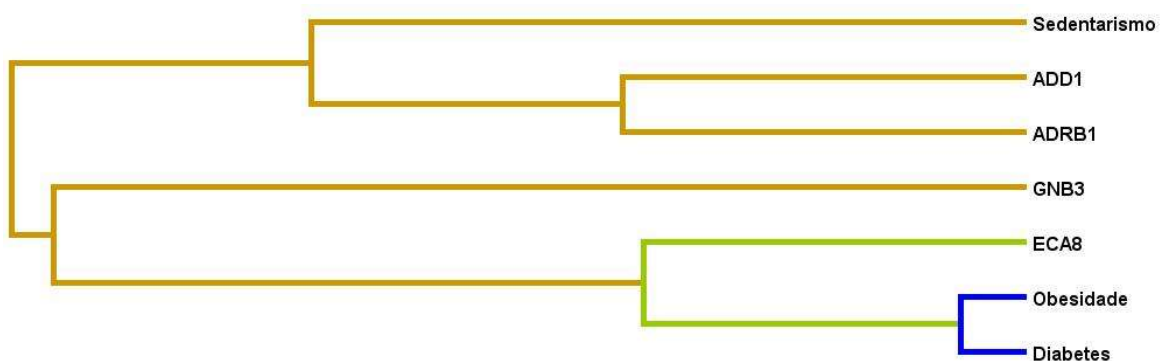


Figura 14 – Dendrograma de interações gene-ambiente das 13 variantes genéticas e os fatores ambientais.

### V.3.5. Estudo genético em subgrupos

Analisámos subgrupos de indivíduos da nossa amostra, consoante género (masculino e feminino), diabetes, obesidade e consumo de sal (alto e baixo consumo de sal), tendo como objetivo encontrar a associação de variantes genéticas com a HTA, nestes subgrupos.

As 13 variantes genéticas estudadas em ambos os grupos, foram: *ACE Ins/Del* rs4340, *ACE A2350G* rs4343, *AGT T174M* rs4762, *AGT M235T* rs699, *AGTR1 A1166C* rs5186, *CYP11B2 -344 C/T* rs1799998, *ADRB1 R389G* rs1801253, *ADRB2 R16G* rs1042713, *ADD1 G460T* rs4961, *SCNN1G G-173A* rs5718, *GNB3 C825T* rs5443, *ATP2B1 A/G* rs2681472, *CYP17A1 T/C* rs11191548.

### V.3.5.1. Género

#### Subgrupo do género masculino

Com uma amostra de 873 indivíduos do sexo masculino, constituímos dois grupos consoante tinham ou não Hipertensão Arterial. Obtivemos um grupo de 458 indivíduos hipertensos (idade média  $51 \pm 8,3$  anos) e outro com 415 controlos (idade média  $50,8 \pm 7,7$  anos) sendo a idade semelhante nos dois grupos ( $p=0,679$ ). Fizemos um estudo caso controlo, com o objetivo de avaliar quais as variantes genéticas estudadas que se associavam ao aparecimento de HTA no género masculino.

#### Frequências Genotípicas por Géneros

**Tabela 15 – Frequências genotípicas das variantes genéticas associadas à HTA, nos grupos caso-controlo da população do sexo masculino.**

| Genes             |    | Casos<br>(n=458) | Controlos<br>(n=415) | Valor p      |
|-------------------|----|------------------|----------------------|--------------|
| ACE rs4340        | II | 55 (12,0%)       | 70 (16,9%)           | <b>0,042</b> |
|                   | ID | 205 (44,8%)      | 194 (46,7%)          |              |
|                   | DD | 198 (43,2%)      | 151 (36,4%)          |              |
| ACE2350<br>rs4343 | AA | 73 (15,9%)       | 82 (19,8%)           | 0,122        |
|                   | AG | 231 (50,4%)      | 217 (52,3%)          |              |
|                   | GG | 154 (33,6%)      | 116 (28,0%)          |              |
| AT1R rs5186       | AA | 250 (54,6%)      | 257 (61,9%)          | 0,076        |
|                   | AC | 180 (39,3%)      | 140 (33,7%)          |              |
|                   | CC | 28 (6,1%)        | 18 (4,3%)            |              |
| ADD1 rs4961       | GG | 325 (71,0%)      | 300 (72,3%)          | 0,088        |
|                   | GT | 117 (25,5%)      | 110 (26,5%)          |              |
|                   | TT | 16 (3,5%)        | 5 (1,2%)             |              |

*Estatisticamente significativo para  $p < 0,05$ .*

O único polimorfismo que apresentou significância no sexo masculino foi o *ACE* rs4340 ( $p=0,042$ ) (Tabela 15).

**Tabela 16 – Variantes genéticas que se associam à HTA no género masculino - Análise Univariada consoante os diferentes modelos genéticos.**

| Genes          | Modelo         | Método           | Odds ratio (IC 95%)          | Valor p      |
|----------------|----------------|------------------|------------------------------|--------------|
| ACE rs4340     | Dominante      | (DD+ID) vs. II   | <b>1,487 (1,015 - 2,177)</b> | <b>0,041</b> |
|                | Recessivo      | DD vs. (II+ID)   | <b>1,331 (1,014 - 1,748)</b> | <b>0,039</b> |
|                | Aditivo        | DD vs. ID vs. II | <b>1,279 (1,054 - 1,552)</b> | <b>0,013</b> |
|                | Multiplicativo | D vs. I          | <b>1,285 (1,058 - 1,561)</b> | <b>0,012</b> |
| ACE2350 rs4343 | Dominante      | (GG+AG) vs. AA   | 1,299 (0,917 - 1,839)        | 0,140        |
|                | Recessivo      | GG vs. (AG+AA)   | 1,306 (0,978 - 1,743)        | 0,070        |
|                | Aditivo        | GG vs. AG vs. AA | <b>1,225 (1,008 - 1,488)</b> | <b>0,041</b> |
|                | Multiplicativo | G vs. A          | <b>1,213 (1,004 - 1,467)</b> | <b>0,046</b> |
| AT1R rs5186    | Dominante      | (CC+AC) vs. AA   | <b>1,353 (1,033 - 1,773)</b> | <b>0,028</b> |
|                | Recessivo      | CC vs. (AC+AA)   | 1,436 (0,782 - 2,637)        | 0,241        |
|                | Aditivo        | CC vs. AC vs. AA | <b>1,296 (1,034 - 1,624)</b> | <b>0,024</b> |
|                | Multiplicativo | C vs. A          | <b>1,290 (1,032 - 1,612)</b> | <b>0,025</b> |
| ADD1 rs4961    | Dominante      | (TT+GT) vs. GG   | 1,068 (0,795 - 1,434)        | 0,664        |
|                | Recessivo      | TT vs. (GT+GG)   | <b>2,968 (1,078 - 8,176)</b> | <b>0,028</b> |
|                | Aditivo        | TT vs. GT vs. GG | 1,149 (0,885 - 1,492)        | 0,297        |
|                | Multiplicativo | T vs. G          | 1,149 (0,885 - 1,492)        | 0,296        |

IC – Intervalo de confiança; Estatisticamente significativo para  $p < 0,05$ .

Das 13 variantes genéticas estudadas de acordo com 4 modelos genéticos (Dominante, Recessivo, Aditivo e Multiplicativo ou frequência alélica), as que se associaram à HTA nos indivíduos do género masculino foram: *ACE I/D* que teve força de associação com HTA em todos os modelos genéticos testados, *ACE2350* demonstrando estar associado à HTA nos modelos aditivo e multiplicativo, *AT1R* com significância estatística nos modelos aditivo e multiplicativo e o gene *ADD1* estando associado à HTA no modelo recessivo.

Todas estas variantes genéticas também se tinham apresentado associadas à HTA no grupo total de indivíduos (Tabela 16).

## Estudo multivariado no género masculino

**Tabela 17 – Estudo gene a gene multivariado: análise de regressão logística, na população do género masculino**

| Variáveis  | B      | E.P.  | Wald  | gl | Odds ratio (IC 95%)   | Valor p      |
|------------|--------|-------|-------|----|-----------------------|--------------|
| ACE rs4340 | ----   | ----  | 6,289 | 2  | ----                  | <b>0,043</b> |
| ID         | 0,296  | 0,206 | 2,066 | 1  | 1,345 (0,898 – 2,015) | 0,151        |
| DD         | 0,512  | 0,210 | 5,942 | 1  | 1,669 (1,106 – 2,519) | <b>0,015</b> |
| Constante  | -0,241 | 0,180 | 1,791 | 1  | 0,786                 | 0,181        |

*\*Método Forward Wald (SPSS vs. 19.0) em que saíram da equação as variantes genéticas: ACE2350, AT1R e ADD1. B – Coeficiente de Beta; E.P. – Erro padrão; gl – graus de liberdade; IC – Intervalo de confiança. Estatisticamente significativo para  $p < 0,05$ .*

Foi feita uma análise de regressão logística para ver quais as variantes genéticas que se relacionam com o aparecimento de HTA no género masculino. As variantes ID e DD do ACE foram as únicas que permaneceram na equação e se associaram de forma significativa e independente com a HTA (Tabela 17).

As análises do ajuste e calibração do modelo multivariado cumpriram os pressupostos.

## Subgrupo do Género Feminino

Do mesmo modo como realizámos para o género masculino, também com 839 indivíduos do género feminino, constituímos dois grupos, consoante tinham ou não Hipertensão Arterial e fizemos um estudo caso controlo com 402 mulheres hipertensas (idade média  $51,8 \pm 7,6$  anos) e 437 mulheres que não tinham HTA (idade média  $50,6 \pm 7,6$  anos) sendo a idade estatisticamente diferente nos dois grupos ( $p=0,023$ ). O objetivo foi avaliar quais das 13 variantes genéticas estudadas se associavam ao aparecimento de HTA no género feminino.

## Estudo Univariado

**Tabela 18 – Frequências genotípicas das variantes genéticas associadas à HTA, nos grupos caso-controlo da população do sexo feminino.**

| Genes       |    | Casos<br>(n=402) | Controlos<br>(n=437) | Valor p      |
|-------------|----|------------------|----------------------|--------------|
| ADD1 rs4961 | GG | 275 (68,4%)      | 317 (72,5%)          | 0,094        |
|             | GT | 113 (28,1%)      | 114 (26,1%)          |              |
|             | TT | 14 (3,5%)        | 6 (1,4%)             |              |
| GNB3 rs5443 | CC | 129 (32,1%)      | 181 (41,4%)          | <b>0,019</b> |
|             | CT | 203 (50,5%)      | 193 (44,2%)          |              |
|             | TT | 70 (17,4%)       | 63 (14,4%)           |              |

*Estatisticamente significativo para  $p < 0,05$ .*

No género feminino foi a variante *GNB3* rs5443, que apresentou significância entre casos e controlos ( $p=0,019$ ) (Tabela 18).

**Tabela 19 – Variantes genéticas que se associam à HTA no género feminino - Análise Univariada consoante os diferentes modelos genéticos.**

| Genes       | Modelo         | Método           | Odds ratio (IC 95%)          | Valor p      |
|-------------|----------------|------------------|------------------------------|--------------|
| ADD1 rs4961 | Dominante      | (TT+GT) vs. GG   | 1,220 (0,906 - 1,642)        | 0,190        |
|             | Recessivo      | TT vs. (GT+GG)   | <b>2,592 (0,986 - 6,811)</b> | <b>0,045</b> |
|             | Aditivo        | TT vs. GT vs. GG | 1,266 (0,972 - 1,649)        | 0,080        |
|             | Multiplicativo | T vs. G          | 1,263 (0,972 - 1,641)        | 0,081        |
| GNB3 rs5443 | Dominante      | (TT+CT) vs. CC   | <b>1,496 (1,128 - 1,986)</b> | <b>0,005</b> |
|             | Recessivo      | TT vs. (CT+CC)   | 1,252 (0,864 - 1,814)        | 0,235        |
|             | Aditivo        | TT vs. CT vs. CC | <b>1,292 (1,062 - 1,572)</b> | <b>0,011</b> |
|             | Multiplicativo | T vs. C          | <b>1,295 (1,064 - 1,575)</b> | <b>0,010</b> |

*IC – Intervalo de confiança; Estatisticamente significativo para  $p < 0,05$ .*

As 13 variantes genéticas foram estudadas de acordo com 4 modelos genéticos (Tabela 19): Dominante, Recessivo, Aditivo, Multiplicativo ou frequência alélica, as que se associaram à HTA nos indivíduos do género feminino foram: *ADD1* no modelo recessivo com OR 2,59 ( $p=0,045$ ) e *GNB3* nos modelos dominante, aditivo e multiplicativo com OR 1,50 ( $p=0,005$ ), OR 1,29 ( $p=0,011$ ) e OR 1,30 ( $p=0,010$ ), respetivamente.



## Estudo Multivariado

Tabela 20 – Estudo gene a gene multivariado: análise de regressão logística, na população do género feminino

| Variáveis   | B      | E.P.  | Wald  | gl | Odds ratio (IC 95%)   | Valor p      |
|-------------|--------|-------|-------|----|-----------------------|--------------|
| <i>GNB3</i> | -----  | ----- | 7,864 | 2  | -----                 | <b>0,020</b> |
| CT          | 0,389  | 0,153 | 6,478 | 1  | 1,476 (1,094 – 1,992) | <b>0,011</b> |
| TT          | 0,444  | 0,208 | 4,540 | 1  | 1,559 (1,036 – 2,346) | <b>0,033</b> |
| Constante   | -0,339 | 0,115 | 8,640 | 1  | 0,713                 | <b>0,003</b> |

\*Método Forward Wald (SPSS vs. 19.0) em que saiu da equação a variante genética ADD1. B – Coeficiente de Beta; E.P. – Erro padrão; gl – graus de liberdade; IC – Intervalo de confiança. Estatisticamente significativo para  $p < 0,05$ .

Foi feita uma análise multivariada (Tabela 20) para determinar as variantes genéticas que se associavam à HTA no género feminino. As variantes CT e TT do *GNB3* foram preditivas independentes HTA e com significância estatística na população do género feminino.

As análises de ajuste e calibração do modelo multivariado cumpriram os pressupostos.

### V.3.5.2. População Diabética

Com uma amostra de 203 indivíduos diabéticos, constituímos dois grupos consoante tinham ou não HTA, um grupo com 163 diabéticos hipertensos (casos) e outro com 40 diabéticos não hipertensos (controlos).

Dos 203 indivíduos estudados, 62% eram do género masculino no grupo dos hipertensos diabéticos e 67,5% no grupo dos controlos. A idade média no grupo dos casos foi de  $54,8 \pm 6,9$  anos e no grupo dos controlos foi de  $54,2 \pm 6,5$  anos. Nenhuma destas variáveis mostrou significância estatística.

## Análise univariada no grupo dos diabéticos

**Tabela 21 – Frequências genotípicas das variantes genéticas associadas à HTA, nos grupos caso-controlo da população diabética.**

| Genes       |    | Casos<br>(n=163) | Controlos<br>(n=40) | Valor p      |
|-------------|----|------------------|---------------------|--------------|
| AT1R rs5186 | AA | 78 (47,9%)       | 31 (77,5%)          | <b>0,003</b> |
|             | AC | 70 (42,9%)       | 8 (20,0%)           |              |
|             | CC | 15 (9,2%)        | 1 (2,5%)            |              |
| ADD1 rs4961 | GG | 118 (72,4%)      | 34 (85,0%)          | 0,160        |
|             | GT | 36 (22,1%)       | 6 (15,0%)           |              |
|             | TT | 9 (5,5%)         | 0 (0,0%)            |              |
| GNB3 rs5443 | CC | 52 (31,9%)       | 20 (50,0%)          | 0,075        |
|             | CT | 92 (56,4%)       | 15 (37,5%)          |              |
|             | TT | 19 (11,7%)       | 5 (12,5%)           |              |

*Estatisticamente significativo para  $p < 0,05$ .*

**Tabela 22 – Variantes genéticas que se associam à HTA no subgrupo dos diabéticos - Análise Univariada consoante os diferentes modelos genéticos.**

| Genes       | Modelo         | Método           | Odds ratio (IC 95%)          | Valor p      |
|-------------|----------------|------------------|------------------------------|--------------|
| AT1R rs5186 | Dominante      | (CC+AC) vs. AA   | <b>3,754 (1,681 - 8,381)</b> | <b>0,001</b> |
|             | Recessivo      | CC vs. (AC+AA)   | 3,953 (0,506 - 30,852)       | 0,159        |
|             | Aditivo        | CC vs. AC vs. AA | <b>3,095 (1,515 - 6,322)</b> | <b>0,002</b> |
|             | Multiplicativo | C vs. A          | <b>3,097 (1,533 - 6,257)</b> | <b>0,001</b> |
| ADD1 rs4961 | Dominante      | (TT+GT) vs. GG   | 2,161 (0,850 - 5,496)        | 0,099        |
|             | Recessivo      | TT vs. (GT+GG)   | -----                        | ----         |
|             | Aditivo        | TT vs. GT vs. GG | 2,193 (0,945 - 5,087)        | 0,068        |
|             | Multiplicativo | T vs. G          | <b>2,449 (1,014 - 5,913)</b> | <b>0,041</b> |
| GNB3 rs5443 | Dominante      | (TT+CT) vs. CC   | <b>2,135 (1,058 - 4,307)</b> | <b>0,032</b> |
|             | Recessivo      | TT vs. (CT+CC)   | 0,924 (0,323 - 2,645)        | 0,882        |
|             | Aditivo        | TT vs. CT vs. CC | 1,535 (0,879 - 2,680)        | 0,132        |
|             | Multiplicativo | T vs. C          | 1,459 (0,866 - 2,460)        | 0,155        |

*IC – Intervalo de confiança; Estatisticamente significativo para  $p < 0,05$ .*

Foi efetuada uma análise univariada para determinar quais as frequências genotípicas que se associavam com HTA nos diabéticos e qual o melhor modelo genético onde se verificava esta associação (Tabela 21 e Tabela 22).

A variante *AT1R* rs5186 mostrou significância estatística na análise caso-controlo da população diabética.

Em seguida procedemos a uma análise univariada com as 13 variantes genéticas estudadas, utilizando os seguintes modelos genéticos: Dominante, Recessivo, Aditivo e

Multiplicativo (Tabela 22). Comprovou-se associação à HTA de 3 variantes genéticas no subgrupo dos diabéticos; *AT1R* em 3 modelos (dominante, aditivo e multiplicativo), *ADD1* no modelo multiplicativo e *GNB3* no modelo dominante.

### **Análise multivariada no grupo dos diabéticos**

**Tabela 23 – Estudo gene a gene multivariado: análise de regressão logística, na população diabética.**

| Variáveis | B     | E.P.  | Wald   | gl | Odds ratio (IC 95%)    | Valor p      |
|-----------|-------|-------|--------|----|------------------------|--------------|
| GNB3      | ----  | ----  | 6,137  | 2  | ----                   | <b>0,046</b> |
| CT        | 0,989 | 0,399 | 6,137  | 1  | 2,690 (1,230 – 5,884)  | <b>0,013</b> |
| TT        | 0,478 | 0,589 | 0,659  | 1  | 1,613 (0,509 – 5,114)  | 0,417        |
| AT1R      | ----  | ----  | 11,186 | 2  | ----                   | <b>0,004</b> |
| AC        | 1,284 | 0,436 | 8,669  | 1  | 3,611 (1,536 – 8,490)  | <b>0,003</b> |
| CC        | 2,024 | 1,067 | 3,597  | 1  | 7,569 (0,935 – 61,298) | 0,058        |
| Constante | 0,373 | 0,307 | 1,478  | 1  | 1,453                  | 0,224        |

\*Método Forward Wald (SPSS vs. 19.0) em que saiu da equação a variante genética *ADD1*. B – Coeficiente de Beta; E.P. – Erro padrão; gl – graus de liberdade; IC – Intervalo de confiança. Estatisticamente significativo para  $p < 0,05$ .

Foi feita uma análise multivariada para determinar as variantes genéticas que se associavam à HTA no grupo dos diabéticos (Tabela 23). As variantes CT e TT do *GNB3* foram preditivas independentes de HTA, na população diabética. No entanto, quanto à significância, o genótipo CT obteve significância estatística ( $p=0,013$ ), mas o TT não obteve ( $p=0,417$ ). Os genótipos AC e CC do polimorfismo *AT1R* também são preditores independentes de HTA na população diabética, mas só o genótipo AC teve significância estatística ( $p=0,003$ ).

Houve boa calibração do modelo da regressão logística, confirmado pelo teste de *Hosmer-Lemeshow* ( $p=0,818$ ). As análises do ajuste e calibração do modelo multivariado cumpriram os pressupostos.

### **V.3.5.3. População Obesa**

Com 458 indivíduos obesos, fizemos um estudo caso-controlo para determinar os preditores genéticos associados à HTA na população obesa. Um grupo com 331 obesos hipertensos (casos) foi comparado com 127 obesos não hipertensos (controles) tendo

sido avaliadas as variantes genéticas que se associavam de forma significativa e independente com HTA.

Dos 458 indivíduos obesos estudados, 55,6% eram do género masculino no grupo dos casos e 62% no grupo dos controlos. A idade média no grupo dos casos foi de  $51,6 \pm 7,5$  anos e no grupo dos controlos de  $50,9 \pm 7,7$  anos. Nenhuma das variáveis demonstrou ter significância estatística.

### **Análise Univariada**

Realizámos uma análise univariada, com as 13 variantes genéticas estudadas, mas nenhuma se associou ao aparecimento de HTA na população obesa.

#### **V.3.5.4. Consumo de Sal**

Nos 860 hipertensos estudados, avaliámos a excreção urinária de sódio, na urina de 24 horas, que se associa com a ingestão de sódio. Dividimos os valores da ingestão de sódio em tercís e calculámos as médias em cada tercís (Tabela 24).

**Tabela 24 – Valores da ingestão de sódio em tercís e sua média em cada tercís**

| <b>Sódio (Urina de 24h)</b> | <b>N</b> | <b>Média <math>\pm</math> desvio padrão</b> | <b>Mínimo</b> | <b>Máximo</b> |
|-----------------------------|----------|---|---------------|---------------|
| 1º tercís (<9,058)          | 285      | $6,78 \pm 1,58$                             | 1,87          | 9,04          |
| 2º tercís (9,058 – 10,689)  | 290      | $9,84 \pm 0,32$                             | 9,06          | 10,69         |
| 3º tercís (>10,689)         | 285      | $14,64 \pm 3,36$                            | 10,69         | 31,04         |
| Total                       | 860      | $10,41 \pm 3,87$                            | 1,87          | 31,04         |

#### **Subgrupo com maior consumo de sal**

Comparámos os Hipertensos com maior consumo de sal, 3º tercís (n=285), com o grupo dos controlos (n=852), com o objetivo de avaliar quais as variantes genéticas estudadas que se associavam ao aparecimento de HTA em indivíduos com maior consumo de sal.

Os Hipertensos com maior consumo de sal, 68,1% eram do género masculino e tinham uma idade média de  $52,2 \pm 8$  anos. No grupo dos controlos 48,7% do género masculino, com idade média de  $50,7 \pm 7,7$  anos. Tanto o género como a idade mostraram significância estatística ( $p < 0,0001$  e  $p = 0,006$ , respetivamente).

Realizámos uma análise univariada, com as 13 variantes genéticas estudadas, mas nenhuma se associou ao aparecimento de HTA na população com maior consumo de sal em relação aos controlos.

### Subgrupo com menor consumo de sal

No grupo dos Hipertensos com menor consumo de sal, 38,2%, eram do género masculino e tinham uma idade média de  $50,9 \pm 7,8$  anos. No grupo dos controlos 48,7% do género masculino, com idade média de  $50,7 \pm 7,7$  anos. Só o género foi significativo ( $p = 0,002$ ).

### Análise univariada na população com menor consumo de sal

**Tabela 25 – Frequência genotípica das variantes genéticas associadas à HTA, nos grupos caso-controlo da população com menor consumo de sal.**

| Genes           |    | Casos<br>HTA com menor<br>consumo de sal<br>(n=285) | Controlos<br>(n=852) | Valor p      |
|-----------------|----|---|----------------------|--------------|
| ADRB1 rs1801253 | GG | 18 (6,3%)   | 101 (11,9%)          | <b>0,029</b> |
|                 | GR | 122 (42,8%)   | 351 (41,2%)          |              |
|                 | RR | 145 (50,9%)   | 400 (46,9%)          |              |
| ADD1 rs4961     | GG | 200 (70,2%)   | 617 (72,4%)          | <b>0,024</b> |
|                 | GT | 74 (26,0%)  | 224 (26,3%)          |              |
|                 | TT | 11 (3,8%)   | 11 (1,3%)            |              |

*Estatisticamente significativo para  $p < 0,05$ .*

**Tabela 26 – Variantes genéticas que se associam à HTA no subgrupo dos indivíduos com menor consumo de sal - Análise Univariada consoante os diferentes modelos genéticos.**

| Genes                     | Modelo         | Método           | Odds ratio (IC 95%)          | Valor p      |
|---------------------------|----------------|------------------|------------------------------|--------------|
| <i>ADRB1</i><br>rs1801253 | Dominante      | (RR+GR) vs. GG   | <b>1,995 (1,185 – 3,357)</b> | <b>0,008</b> |
|                           | Recessivo      | RR vs. (GR+GG)   | 1,170 (0,895 – 1,531)        | 0,250        |
|                           | Aditivo        | RR vs. GR vs. GG | <b>1,245 (1,012 – 1,531)</b> | <b>0,038</b> |
|                           | Multiplicativo | R vs. G          | <b>1,253 (1,016 – 1,545)</b> | <b>0,035</b> |
| <i>ADD1</i> rs4961        | Dominante      | (TT+GT) vs. GG   | 1,116 (0,831 - 1,499)        | 0,466        |
|                           | Recessivo      | TT vs. (GT+GG)   | <b>3,069 (1,316 - 7,158)</b> | <b>0,006</b> |
|                           | Aditivo        | TT vs. GT vs. GG | 1,207 (0,929 - 1,567)        | 0,159        |
|                           | Multiplicativo | T vs. G          | 1,200 (0,928 - 1,553)        | 0,164        |

IC – Intervalo de confiança; Estatisticamente significativo para  $p < 0,05$ .

Foi efetuada uma análise univariada para determinar quais as frequências genotípicas que se associavam com HTA nos indivíduos com menor consumo de sal e qual o melhor modelo genético onde se verificava esta associação (Tabela 25 e Tabela 26).

Neste subgrupo, na análise caso-controlo, verificamos existir duas variantes genéticas associadas com HTA, *ADRB1* rs1801253 e *ADD1* rs4961 (Tabela 25).

Comparámos nos dois grupos as 13 variantes genéticas estudadas de acordo com 4 modelos genéticos já descritos (Tabela 26). Os polimorfismos do gene *ADRB1*, nos modelos dominante, aditivo e multiplicativo associaram-se à HTA nos indivíduos com menor consumo de sal, (OR 1,995 ( $p=0,008$ ); OR 1,25 ( $p=0,038$ ); OR 1,25 ( $p=0,035$ ), respetivamente), assim como os da variante *ADD1* no modelo recessivo (OR 3,07  $p=0,006$ ).

## Análise multivariada

**Tabela 27 – Estudo gene a gene multivariado: análise de regressão logística**

| Variáveis    | B      | E.P.  | Wald   | gl | Odds ratio (IC 95%)   | Valor p           |
|--------------|--------|-------|--------|----|-----------------------|-------------------|
| <i>ADD1</i>  | -----  | ----- | 6,781  | 2  | -----                 | <b>0,034</b>      |
| GT           | 0,039  | 0,158 | 0,061  | 1  | 1,040 (0,763 – 1,416) | 0,805             |
| TT           | 1,136  | 0,436 | 6,781  | 1  | 3,115 (1,324 – 7,326) | <b>0,009</b>      |
| <i>ADRB1</i> | -----  | ----- | 6,898  | 2  | -----                 | <b>0,032</b>      |
| GR           | 0,665  | 0,277 | 5,743  | 1  | 1,944 (1,129 – 3,350) | <b>0,017</b>      |
| RR           | 0,717  | 0,275 | 6,823  | 1  | 2,049 (1,196 – 3,509) | <b>0,009</b>      |
| Constante    | -1,764 | 0,262 | 45,321 | 1  | 0,171                 | <b>&lt;0,0001</b> |

\*Método Forward Wald (SPSS vs. 19.0). B – Coeficiente de Beta; E.P. – Erro padrão; gl – graus de liberdade; IC – Intervalo de confiança. Estatisticamente significativo para  $p < 0,05$ .

Com uma análise de regressão logística determinámos as variantes genéticas com capacidade preditora de HTA nos indivíduos com menor consumo de sal (Tabela 27). As que permaneceram na equação foram as dos polimorfismos *ADRB1* e *ADD1*, associando-se à HTA nos indivíduos com baixo consumo de sal, de forma significativa e independente. Com OR de 3,115 (IC 95% 1,324 – 7,326;  $p=0,009$ ) no genótipo TT do polimorfismo *ADD1* e 2,049 (IC 95% 1,196 – 3,509;  $p=0,009$ ) no genótipo RR da variante *ADRB1*.

Houve boa calibração do modelo da regressão logística, confirmado pelo teste de Hosmer-Lemeshow ( $p=0,984$ ).

As análises do ajuste e calibração do modelo multivariado cumpriram os pressupostos.

### V.3.6. Estudo genético no aparecimento de lesões dos órgãos alvo nos Hipertensos

Foi estudada uma amostra de 600 doentes hipertensos em relação ao aparecimento de Lesões de Órgão Alvo (LOA), nomeadamente insuficiência renal, retinopatia hipertensiva, cardiopatia hipertensiva e doença cerebrovascular (AVC/AIT).

## Insuficiência Renal

No grupo dos hipertensos estudados em relação ao aparecimento de lesões de órgão alvo (n=600), foram excluídos os diabéticos pelo fato de não ser possível estabelecer a etiologia da insuficiência renal/lesão renal.

Finalmente foi avaliada uma amostra de 545 indivíduos hipertensos, em relação ao aparecimento de Insuficiência renal/lesão renal. Destes, 75 apresentavam Insuficiência renal/lesão renal e foram comparados com o grupo de hipertensos sem essa lesão (n=470), com o objetivo de avaliar quais as variantes genéticas preditivas de insuficiência renal em hipertensos.

**Tabela 28 – Número de indivíduos e gravidade da Insuficiência renal/Lesão renal**

| Gravidade           |  | Total<br>(n=75, %)  |
|---------------------|--|---------------------|
| Insuficiência Renal | Clearance Cr.<30ml/min                                 | 2 (2,7%)            |
|                     | Clearance Cr. 30-59ml/min                              | 21 (28%)            |
| Gravidade           |  | Total<br>(n=522, %) |
| Lesão renal         | Clearance Cr.≥60ml/min & Microalbuminúria 30-300mg/24h | 52 (10%)            |

Dos 545 hipertensos estudados, 23 apresentavam clearance da creatinina <60ml/min. Nos restantes (n=522) com clearance ≥60ml/min, foi avaliada a existência de microalbuminúria (30-300mg/24h) tendo-se verificado a sua existência em 52 indivíduos.

O grupo dos Hipertensos com insuficiência renal/lesão renal eram mais idosos (idade média 52,1 ± 8,7 anos), mas sem significância estatística (p=0,099) e tinham maior frequência do género masculino (65,3%, p=0,010) quando comparado com o grupo dos hipertensos sem IR /lesão renal.



## Análise univariada nos hipertensos com IR/lesão renal

**Tabela 29 – Frequência genotípica das variantes genéticas associadas à HTA, nos grupos com e sem IR/lesão renal.**

| Genes            |    | Casos<br>(IR/lesão renal)<br>(n=75) | Controlos<br>(sem IR/lesão renal)<br>(n=470) | Valor p      |
|------------------|----|-------------------------------------|--|--------------|
| ATP2B1 rs2681472 | AA | 44 (58,7%)                          | 340 (72,3%)                                  | <b>0,013</b> |
|                  | AG | 27 (36,0%)                          | 123 (26,2%)                                  |              |
|                  | GG | 4 (5,3%)                            | 7 (1,5%)                                     |              |

*Estatisticamente significativo para  $p < 0,05$ .*

A análise univariada demonstrou haver significância estatística entre os genótipos da variante *ATP2B1* rs2681472 no grupo dos doentes hipertensos com insuficiência renal vs os hipertensos que não a apresentavam (Tabela 29).

**Tabela 30 – Variantes genéticas que se associam à insuficiência renal nos hipertensos.**

| Genes               | Modelo         | Método           | Odds ratio (IC 95%)    | Valor p      |
|---------------------|----------------|------------------|------------------------|--------------|
| ATP2B1<br>rs2681472 | Dominante      | (GG+AG) vs. AA   | 1,843 (1,115 – 3,044)  | <b>0,016</b> |
|                     | Recessivo      | GG vs. (AG+AA)   | 3,726 (1,064 – 13,054) | <b>0,028</b> |
|                     | Aditivo        | GG vs. AG vs. AA | 1,837 (1,189 – 2,839)  | <b>0,006</b> |
|                     | Multiplicativo | G vs. A          | 1,784 (1,173 – 2,714)  | <b>0,006</b> |

*IC – Intervalo de confiança; estatisticamente significativo para  $p < 0,05$ .*

Estudámos nos dois grupos as 13 variantes genéticas de acordo com os 4 modelos genéticos (Tabela 30). A variante genética *ATP2B1* rs2681472 mostrou ter significância estatística em todos os modelos estudados, associando-se assim ao aparecimento de IR/lesão renal nos hipertensos, com um OR do melhor modelo de 3,726 (1,064 – 13,054),  $p=0,028$ .

## Análise multivariada

**Tabela 31 – Estudo gene a gene multivariado: análise de regressão logística**

| Variáveis | B      | E.P.  | Wald    | gl | Odds ratio (IC 95%)    | Valor p           |
|-----------|--------|-------|---------|----|------------------------|-------------------|
| ATP2B1    | -----  | ----- | 8,031   | 2  | -----                  | <b>0,018</b>      |
| AG        | 0,528  | 0,266 | 3,942   | 1  | 1,696 (1,007 – 2,858)  | <b>0,047</b>      |
| GG        | 1,485  | 0,647 | 5,270   | 1  | 4,416 (1,243 – 15,691) | <b>0,022</b>      |
| Constante | -2,045 | 0,160 | 162,886 | 1  | 0,129                  | <b>&lt;0,0001</b> |

\*Método Forward Wald (SPSS vs.19.0). B – Coeficiente de Beta; E.P. – Erro padrão; gl – graus de liberdade; IC – Intervalo de confiança. Estatisticamente significativo para  $p < 0,05$ .

Após análise multivariada (Tabela 31) a variante genética *ATP2B1* rs2681472 mantém-se na equação e associa-se de forma significativa e independente à IR/lesão renal nos hipertensos. Salienta-se o facto dos indivíduos portadores do genótipo GG do *ATP2B1* têm um poder preditivo de IR/lesão renal em hipertensos, com (OR 4,4) e significância estatística ( $p=0,022$ ).

As análises do ajuste e calibração do modelo multivariado cumpriram os pressupostos.

## Retinopatia Hipertensiva

Na mesma amostra de 600 indivíduos hipertensos foi investigado o aparecimento de retinopatia hipertensiva.

Foi efetuado um estudo caso/controlo, sendo os hipertensos com retinopatia considerados casos ( $n=172$ ), e os que não apresentavam retinopatia considerados controlos ( $n=428$ ). Neste grupo foram estimadas as variantes genéticas preditivas desta lesão de órgão alvo.

O grupo dos Hipertensos com retinopatia tinham idade média de  $50,3 \pm 7,7$  anos e 54,7% eram do género masculino. Os hipertensos sem retinopatia tinham idade média de  $51,2 \pm 7,7$  anos e 52,6% eram do género masculino. Nem a idade nem o género mostrou significância estatística.

Realizámos uma análise univariada, com as 13 variantes genéticas estudadas, mas nenhuma se associou ao aparecimento de retinopatia hipertensiva.

## Cardiopatía Hipertensiva

Na amostra de 600 hipertensos 319 efetuaram ecocardiograma. Destes, 137 apresentavam critérios ecocardiográficos de HVE/disfunção diastólica. Nos restantes (n=281) foram usados os critérios eletrocardiográficos de HVE tendo-se verificado que 28 apresentavam HVE.

**Tabela 32 – Doentes com Cardiopatía Hipertensiva**

| <b>Ecocardiograma/doppler cardíaco</b> | <b>Total<br/>(n=319, %)</b> |
|--|-----------------------------|
| Disfunção diastólica                   |                             |
| Não (0-1 critérios)                    | 244 (77)                    |
| Indeterminado (2 critérios)            | 66 (20,8)                   |
| Sim (3-4 critérios)                    | 7 (2,2)                     |
| Hipertrofia                            |                             |
| Não                                    | 184 (58)                    |
| Sim                                    | 133 (42)                    |

| <b>Eletrocardiograma</b> | <b>Total<br/>(n=281, %)</b> |
|--------------------------|-----------------------------|
| Com critérios de HVE     | 28 (10)                     |
| Sem critérios de HVE     | 253 (90)                    |

Efetuámos um estudo caso/controlo, em que os que apresentavam cardiopatía hipertensiva foram considerados casos (n=165) e os hipertensos sem cardiopatía hipertensiva controlos (n=435). O grupo dos Hipertensos com cardiopatía tinha uma idade média de  $53,7 \pm 7,4$  anos e (52,6%) do género masculino. Os controlos tinham idade média de  $49,8 \pm 7,5$  anos e (53,8%) do género masculino. Houve diferença significativa em relação à variável idade entre os dois grupos ( $p < 0,0001$ ).

## Análise Univariada

**Tabela 33 – Frequência genotípica das variantes associadas à cardiopatia hipertensiva**

| Genes         |    | Cardiopatia    |                | Valor p      |
|---------------|----|----------------|----------------|--------------|
|               |    | Sim<br>(n=165) | Não<br>(n=435) |              |
| SCNN1G rs5718 | AA | 49 (29,7)      | 89 (20,5)      | <b>0,031</b> |
|               | AG | 70 (42,4)      | 188 (43,2)     |              |
|               | GG | 46 (27,9)      | 158 (36,3)     |              |

*Estatisticamente significativo para  $p < 0,05$ .*

Avaliámos quais as variantes genéticas que se associavam ao aparecimento de cardiopatia nos hipertensos. Só a variante *SCNN1G* mostrou significância estatística no aparecimento de cardiopatia hipertensiva.

**Tabela 34 – Variantes genéticas que se associam ao aparecimento de cardiopatia hipertensiva**

| Genes         | Modelo         | Método           | Odds ratio (IC 95%)   | Valor p      |
|---------------|----------------|------------------|-----------------------|--------------|
| SCNN1G rs5718 | Dominante      | (GG+AG) vs. AA   | 0,609 (0,405 – 0,915) | <b>0,016</b> |
|               | Recessivo      | GG vs. (AG+AA)   | 0,678 (0,458 – 1,003) | 0,051        |
|               | Aditivo        | GG vs. AG vs. AA | 0,729 (0,573 – 0,927) | <b>0,010</b> |
|               | Multiplicativo | G vs. A          | 0,700 (0,543 – 0,903) | <b>0,006</b> |

*IC – Intervalo de confiança; Estatisticamente significativo para  $p < 0,05$ .*

Avaliámos os 4 modelos genéticos e a variante *SCNN1G* apresentou significância estatística em todos mesmo no modelo recessivo.

## Análise Multivariada

**Tabela 35 – Estudo gene a gene multivariado: análise de regressão logística**

| Variáveis     | B      | E.P.  | Wald   | gl | OR (IC 95%)           | Valor p      |
|---------------|--------|-------|--------|----|-----------------------|--------------|
| <i>SCNN1G</i> | ----   | ----  | 6,881  | 2  | ----                  | <b>0,032</b> |
| AG            | -0,391 | 0,226 | 2,985  | 1  | 0,676 (0,434 – 1,054) | 0,084        |
| GG            | -0,637 | 0,244 | 6,798  | 1  | 0,529 (0,328 – 0,854) | <b>0,009</b> |
| Constante     | -,0597 | 0,178 | 11,256 | 1  | 0,551                 | <b>0,001</b> |

\*Método Forward Wald (SPSS vs.19.0). B – Coeficiente de Beta; E.P. – Erro padrão; gl – graus de liberdade; IC – Intervalo de confiança. Estatisticamente significativo para  $p < 0,05$ .

Na análise multivariada a variante *SCNN1G* manteve-se na equação com significância estatística.

### **Doença Cerebrovascular (AVC/AIT):**

Como atrás referido, não foi possível fazer um estudo caso/controlo, em virtude da dimensão da amostra ( $n=24$ ) não o permitir de forma confiável.

### **Estudo combinado dos fatores que se associam ao aparecimento de lesões nos órgãos alvo nos hipertensos - fatores genéticos e fatores preditores não genéticos**

#### **Fatores preditores de aparecimento de lesões de órgão alvo - não genéticos**

Numa amostra de 600 hipertensos, fizemos um estudo caso controlo, consoante tinham ou não pelo menos 1 lesão de órgão alvo (retinopatia hipertensiva, IR/lesão renal, cardiopatia, AVC/AIT). Foram assim constituídos dois grupos, os casos, hipertensos com pelo menos uma LOA ( $n=330$ ) e os controlos, hipertensos sem lesão de órgão alvo ( $n=270$ ) e comparámo-los, tendo com o objetivo averiguar quais as variantes genéticas que prediziam o aparecimento de LOA. Considerámos fatores de risco não genéticos no aparecimento de lesões de órgão alvo em hipertensos, os seguintes: idade, género, HTA controlada e tempo de diagnóstico (anos).

**Tabela 36 – Características dos fatores de risco ao aparecimento de LOA**

| Variáveis                  | Lesões alvo (LOA)         |                    | Valor p |
|----------------------------|---------------------------|--------------------|---------|
|                            | Pelo menos uma<br>(n=330) | Nenhuma<br>(n=270) |         |
| Sexo Masculino, n (%)      | 187 (56,7)                | 132 (48,9)         | 0,058   |
| Idade, anos                | 51 ± 7,9                  | 50,9 ± 7,5         | 0,857   |
| HTA controlada, n (%)      | 179 (54,2)                | 159 (58,9)         | 0,254   |
| Tempo de diagnóstico, anos | 8,4 ± 8,8                 | 6,7 ± 6            | 0,005   |

*Estatisticamente significativo para  $p < 0,05$ .*

Não houve diferença significativa entre os dois grupos em relação à idade, ao género e ao fato de os doentes terem a HTA controlada ou não. Só o tempo de diagnóstico é que apresentou diferenças significativas entre os dois grupos ( $p=0,005$ ).

#### Análise Univariada

**Tabela 37 – Frequência genotípica das variantes genéticas no aparecimento de LOA**

| Genes            |    | Lesões alvo (LOA)         |                    | Valor p      |
|------------------|----|---------------------------|--------------------|--------------|
|                  |    | Pelo menos uma<br>(n=330) | Nenhuma<br>(n=270) |              |
| ADRB1 rs1801253  | GG | 21 (6,4)                  | 25 (9,3)           | <b>0,015</b> |
|                  | GR | 130 (39,4)                | 130 (48,1)         |              |
|                  | RR | 179 (54,2)                | 115 (42,6)         |              |
| SCNN1G rs5718    | AA | 79 (23,9)                 | 59 (21,9)          | <b>0,045</b> |
|                  | AG | 153 (46,4)                | 105 (38,9)         |              |
|                  | GG | 98 (29,7)                 | 106 (39,3)         |              |
| ATP2B1 rs2681472 | AA | 229 (69,4)                | 204 (75,6)         | 0,063        |
|                  | AG | 91 (27,6)                 | 64 (23,7)          |              |
|                  | GG | 10 (3)                    | 2 (0,7)            |              |

*Estatisticamente significativo para  $p < 0,05$ .*

Em seguida foram investigados os fatores genéticos que se associaram a LOA nos Hipertensos (Tabela 37). Existiram diferenças significativas entre os genótipos nas variantes *ADRB1* e *SCNN1G*.

**Tabela 38 – Variantes genéticas que se associam ao aparecimento de LOA nos Hipertensos.**

| Genes                      | Modelo         | Método           | Odds ratio (IC 95%)    | Valor p      |
|----------------------------|----------------|------------------|------------------------|--------------|
| <i>ADRB1</i><br>rs1801253  | Dominante      | (RR+GR) vs. GG   | 1,502 (0,821 – 2,747)  | 0,185        |
|                            | Recessivo      | RR vs. (GR+GG)   | 1,598 (1,155 – 2,210)  | <b>0,005</b> |
|                            | Aditivo        | RR vs. GR vs. GG | 1,446 (1,117 – 1,872)  | <b>0,005</b> |
|                            | Multiplicativo | R vs. G          | 1,419 (1,105 – 1,821)  | <b>0,006</b> |
| <i>SCNN1G</i><br>rs5718    | Dominante      | (GG+AG) vs. AA   | 0,888 (0,605 – 1,304)  | 0,546        |
|                            | Recessivo      | GG vs. (AG+AA)   | 0,654 (0,465 – 0,918)  | <b>0,014</b> |
|                            | Aditivo        | GG vs. AG vs. AA | 0,811 (0,653 – 1,007)  | 0,058        |
|                            | Multiplicativo | G vs. A          | 0,789 (0,628 – 0,993)  | <b>0,043</b> |
| <i>ATP2B1</i><br>rs2681472 | Dominante      | (GG+AG) vs. AA   | 1,363 (0,948 – 1,960)  | 0,094        |
|                            | Recessivo      | GG vs. (AG+AA)   | 4,188 (0,910 – 19,278) | 0,075        |
|                            | Aditivo        | GG vs. AG vs. AA | 1,413 (1,016 – 1,967)  | <b>0,040</b> |
|                            | Multiplicativo | G vs. A          | 1,403 (1,013 – 1,944)  | <b>0,041</b> |

IC – Intervalo de confiança; estatisticamente significativo para  $p < 0,05$ .

Podemos observar pela Tabela 38 que a variante genética *ADRB1* mostrou significância estatística em 3 modelos genéticos: recessivo ( $p=0,005$ ); aditivo ( $p=0,005$ ) e no modelo multiplicativo ( $p=0,006$ ). A variante *SCNN1G* apresentou significância apenas em 2 modelos: recessivo ( $p=0,014$ ) e multiplicativo ( $p=0,043$ ) assim como a variante *ATP2B1* com apenas 2 modelos: aditivo ( $p=0,040$ ) e multiplicativo ( $p=0,041$ ).

## Análise Multivariada

**Tabela 39 – Fatores de risco não genéticos associados ao aparecimento de LOA**

| Variáveis            | B      | E.P.  | Wald  | gl | Odds ratio (IC 95%)   | Valor p      |
|----------------------|--------|-------|-------|----|-----------------------|--------------|
| Sexo masculino       | 0,403  | 0,169 | 5,713 | 1  | 1,496 (1,075 – 2,082) | <b>0,017</b> |
| Tempo de diagnóstico | 0,036  | 0,012 | 8,856 | 1  | 1,037 (1,012 – 1,062) | <b>0,003</b> |
| Constante            | -0,279 | 0,158 | 3,095 | 1  | 0,757                 | 0,079        |

\*Método Forward Wald (SPSS vs.19.0) em que saíram da equação as variáveis: HTA controlada e a Idade. B – Coeficiente de Beta; E.P. – Erro padrão; gl – graus de liberdade; IC – Intervalo de confiança. Estatisticamente significativo para  $p < 0,05$ .

Podemos observar, no nosso estudo, após análise multivariada, que o tempo de diagnóstico (anos) se associou de forma independente e significativa a ter lesões de órgão alvo com um OR 1,037 (IC 95% 1,012 – 1,062;  $p=0,003$ ). A variável sexo também manteve-se na equação com um OR 1,496 (IC 95% 1,075 – 2,082;  $p=0,017$ ) (Tabela 39).

Houve boa calibração do modelo da regressão logística, confirmado pelo teste de Hosmer-Lemeshow ( $p=0,826$ ).

As análises do ajuste e calibração do modelo multivariado cumpriram os pressupostos.

**Tabela 40 – Estudo gene a gene multivariado: análise de regressão logística**

| Variáveis    | B      | E.P.  | Wald  | gl | Odds ratio (IC 95%)   | Valor p      |
|--------------|--------|-------|-------|----|-----------------------|--------------|
| <i>ADRB1</i> | -----  | ----- | 8,315 | 2  | -----                 | <b>0,016</b> |
| GR           | 0,174  | 0,321 | 0,295 | 1  | 1,190 (0,635 – 2,233) | 0,587        |
| RR           | 0,617  | 0,319 | 3,734 | 1  | 1,853 (0,991 – 3,464) | 0,053        |
| Constante    | -0,174 | 0,296 | 0,347 | 1  | 0,840                 | 0,556        |

\*Método Forward Wald (SPSS vs.19.0). Saíram da equação as variantes *SCNN1G* e *ATP2B1*. B – Coeficiente de Beta; E.P. – Erro padrão; gl – graus de liberdade; IC – Intervalo de confiança. Estatisticamente significativo para  $p<0.05$ .

Foi depois efetuado um estudo gene a gene multivariado (análise de regressão logística), para analisar quais as variáveis que se associavam a LOA de forma significativa (Tabela 40).

Feita análise de regressão logística a variante *ADRB1* foi a única que se associou ao aparecimento de LOA nos hipertensos, pois manteve-se na equação com significância estatística.

As análises do ajuste e calibração do modelo multivariado cumpriram os pressupostos.

### **Análise combinada dos fatores genéticos e fatores preditivos não genéticos associados ao aparecimento de lesões nos órgãos alvo em hipertensos**

**Tabela 41 – Fatores preditivos genéticos e não genéticos associados ao aparecimento de Lesões dos Órgãos Alvo nos Hipertensos: análise de regressão logística**

| Variáveis            | B      | E.P.  | Wald   | gl | Odds ratio (IC 95%)   | Valor p           |
|----------------------|--------|-------|--------|----|-----------------------|-------------------|
| Sexo                 | 0,414  | 0,170 | 5,891  | 1  | 1,512 (1,083 – 2,112) | <b>0,015</b>      |
| Tempo de diagnóstico | 0,037  | 0,012 | 8,956  | 1  | 1,037 (1,013 – 1,063) | <b>0,003</b>      |
| <i>ADRB1</i>         | 0,351  | 0,134 | 6,896  | 1  | 1,420 (1,093 – 1,845) | <b>0,009</b>      |
| <i>ATP2B1</i>        | 0,340  | 0,172 | 3,920  | 1  | 1,405 (1,003 – 1,966) | <b>0,048</b>      |
| Constante            | -0,881 | 0,252 | 12,208 | 1  | 0,414                 | <b>&lt;0,0001</b> |

\*Método Forward Wald (SPSS vs.19.0) em que saíram da equação as variáveis: HTA controlada; a Idade e o gene *SCNN1G*. B – Coeficiente de Beta; E.P. – Erro padrão; gl – graus de liberdade; IC – Intervalo de confiança. Estatisticamente significativo para  $p<0.05$ .

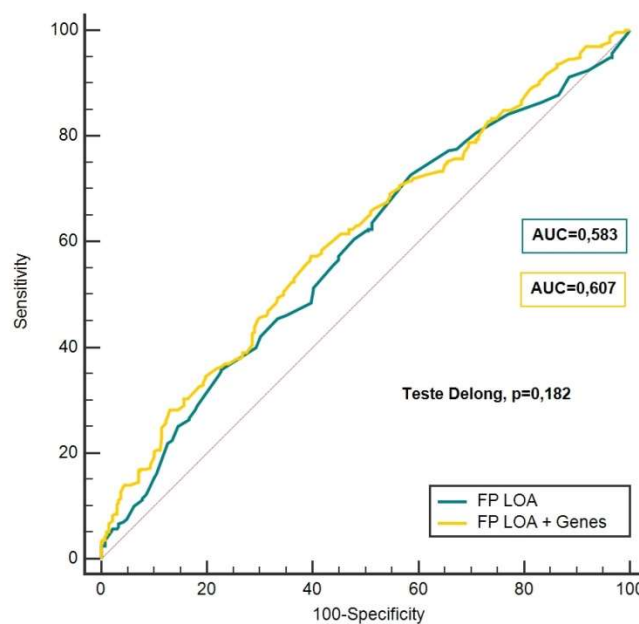


Feito um estudo combinado por análise multivariada, com as variantes genéticas que na análise univariada se associaram ao aparecimento de LOA e os fatores não genéticos preditivos de LOA pretendemos averiguar quais destas variáveis tinham capacidade preditiva de LOA.

As variáveis que se associaram de forma significativa e independente com LOA nos hipertensos foram: as variantes *ADRB1* (OR 1,420) e *ATP2B1* (OR 1,405) com  $p=0,009$  e  $p=0,048$ , respetivamente. O sexo e o tempo de diagnóstico também se associaram de forma independente e significativa (Tabela 41).

Houve boa calibração do modelo da regressão logística, confirmado pelo teste de *Hosmer-Lemeshow* ( $p=0,599$ ).

As análises do ajuste e calibração do modelo multivariado cumpriram os pressupostos.



**Figura 15 – Curvas ROC e respectivas AUC para os fatores preditores de lesões de Órgãos Alvo nos Hipertensos (FP LOA) e dos FP LOA + variantes genéticas.**

Com o cálculo de uma curva ROC a partir dos fatores preditivos de LOA e da sua respetiva AUC, obtivemos o poder preditivo de LOA nos hipertensos, que apresentou o valor de

0,583. Em seguida foi efetuada uma nova curva ROC com os fatores preditivos de LOA associados às duas variantes genéticas, pelo que a AUC aumentou para 0,607 (Figura 15).

**Tabela 42 – Curvas de ROC e respetivas AUC para os fatores preditores de lesões dos Órgãos Alvo nos Hipertensos (Fatores preditores de LOA e estes fatores + 2 variantes genéticas).**

| Modelos              | AUC<br>(IC 95%)       | Sensib.<br>(%) | Especif.<br>(%) | VPP  | VPN  | Teste<br>Delong<br>(p) |
|----------------------|-----------------------|----------------|-----------------|------|------|------------------------|
| FP LOA               | 0,583 (0,542 – 0,622) | 72,4           | 41,6            | 1,24 | 0,66 | 0,182                  |
| FP LOA + 2 variantes | 0,607 (0,567 – 0,647) | 57,3           | 60,2            | 1,44 | 0,71 |                        |

*FP LOA – Fatores preditores de Lesões de órgãos alvo nos hipertensos; AUC – Area under the curve; IC – Intervalo de confiança; Sensib. – Sensibilidade; Especif. – Especificidade; VPP – Valor preditivo positivo; VPN – Valor preditivo negativo; Estatisticamente significativo para  $p < 0,05$ .*

No entanto quando comparámos estas AUC's, pelo Teste Delong, com o fim de avaliar o valor preditivo adicional, observamos que esta diferença não apresentava significância estatística ( $p=0,182$ ). Concluímos que, ao adicionar aos fatores preditivos de LOA as variantes que na análise univariada se tinham associado ao aparecimento de LOA, aumentamos o poder preditivo do modelo, à custa de uma melhoria da especificidade (de 41,6% para 60,2%), com redução da sensibilidade (de 72,4% para 57,3%), mas sem significância estatística ( $p=0,182$ ) (Tabela 42).

### **Modelos de interação entre fatores genéticos e não genéticos preditivos de lesões dos órgãos alvo**

Usando a análise *data mining* por MDR, foram elaborados modelos de interação genéticos e não genéticos preditivos de LOA (idade, género, HTA controlada e tempo de diagnóstico). Foram usadas as variantes genéticas que na análise univariada se associaram ao aparecimento de LOA e os fatores não genéticos preditivos de LOA tendo como objetivo avaliar por MDR, o melhor modelo de interação, na predição de aparecimento de LOA.

**Tabela 43 – Modelos de interação entre genes e os fatores preditores de lesões dos órgãos alvo, pelo MDR.**

| Melhores modelos  | Treino             |                               |                   | Teste              |                               |              | Consistência VC |
|---|--------------------|-------------------------------|-------------------|--------------------|-------------------------------|--------------|-----------------|
|   | Acurácia ponderada | Odds ratio (IC 95%)           | Valor p           | Acurácia ponderada | Odds ratio (IC 95%)           | Valor p      |                 |
| <i>ADRB1</i>  | 0,558              | 1,60<br>(1,14 – 2,25)         | <b>0,007</b>      | 0,558              | 1,60<br>(0,57 – 4,45)         | 0,369        | 10/10           |
| Tempo de diagnóstico;<br><i>ADRB1</i>                           | 0,564              | 1,70<br>(1,20 – 2,41)         | <b>0,003</b>      | 0,516              | 1,14<br>(0,40 – 3,21)         | 0,806        | 6/10            |
| Sexo; <i>ADRB1</i> ; <i>ATP2B1</i>                              | 0,583              | 1,98<br>(1,40 – 2,81)         | <b>0,0001</b>     | 0,505              | 1,04<br>(0,37 – 2,93)         | 0,937        | 5/10            |
| <b>Idade; Tempo de diagnóstico; <i>ADRB1</i>; <i>ATP2B1</i></b> | <b>0,616</b>       | <b>2,58<br/>(1,82 – 3,66)</b> | <b>&lt;0,0001</b> | <b>0,557</b>       | <b>1,58<br/>(0,57 – 4,40)</b> | <b>0,382</b> | <b>10/10</b>    |

*MDR – Multifactor dimensionality reduction; VC – Validação cruzada; IC – Intervalo de confiança. Melhor modelo com 4 variáveis inclui: ADRB1; ATP2B1; Idade; Tempo de diagnóstico (anos). Estatisticamente significativo para  $p < 0,05$ .*

Com recurso à análise de *data mining* verifica-se que o melhor modelo de interação entre os fatores preditivos de LOA e as 3 variantes genéticas significativas na univariada foi entre a Idade, o tempo de diagnóstico e os genes *ADRB1*, *ATP2B1*, com OR no treino de 2,58 (IC a 95% 1,82 – 3,66;  $p < 0,0001$ ) e no Teste OR de 1,58 (IC a 95% 0,57 – 4,40), sem significância estatística. A consistência de validação cruzada foi de 10/10, com acuidade ponderada do teste foi de 62%. Podemos concluir que é um bom modelo de interação, visto que a acurácia do treino foi de 62% e do teste 56% e a consistência foi de 10/10.

A variável HTA controlada não constou em nenhum modelo de interação.

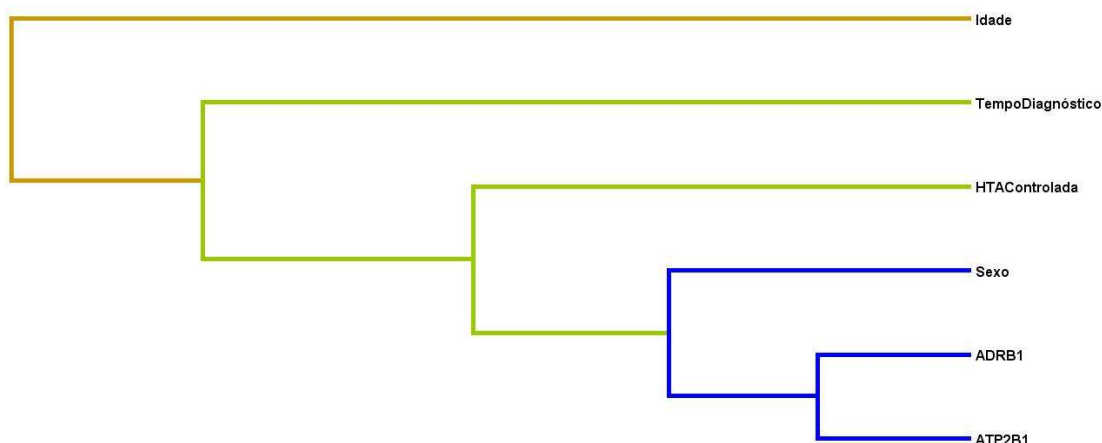


Figura 16 – MDR de todos fatores preditores genéticos e fatores preditores não genéticos de aparecimento de lesões dos Órgãos Alvo nos Hipertensos

### V.3.8. Construção de um *score* de risco genético para Hipertensão Arterial

#### V.3.8.1. Distribuição do número de alelos de risco no grupo dos hipertensos e dos controles

Com as 13 variantes genéticas estudadas avaliámos na nossa população (1712 indivíduos), 860 casos e 852 controles, a distribuição do número de alelos de risco em cada grupo.

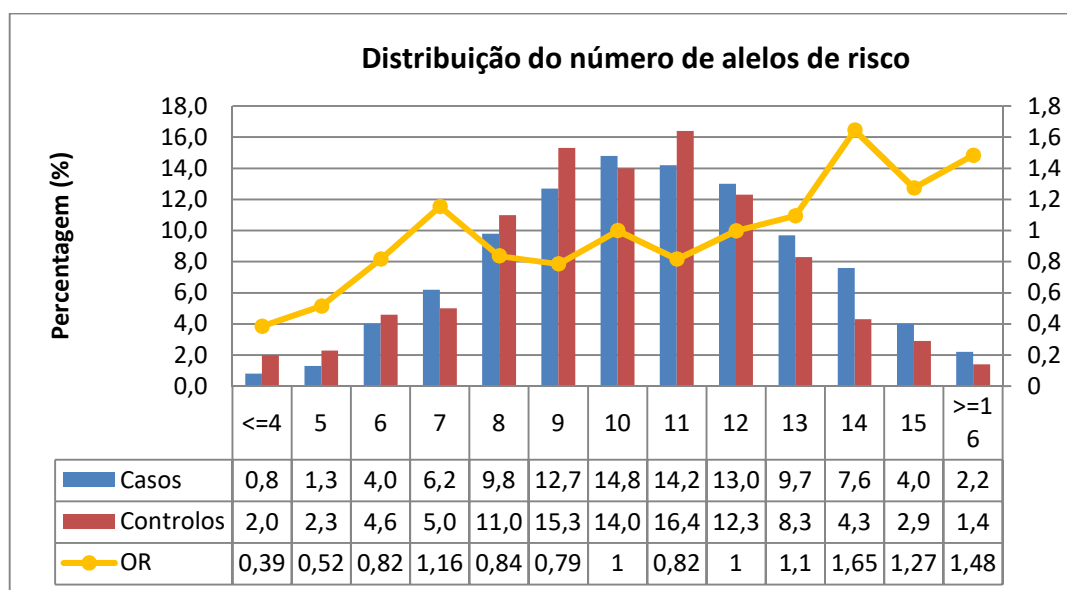


Figura 17 – Distribuição do número de alelos de risco no grupo de casos e controlos na população total.

Podemos observar na figura que a partir do 11º alelo temos mais casos do que controlos, verificando-se na generalidade o oposto no grupo com menos de 10 alelos de risco.

Quanto maior o número de alelos de risco, verifica-se maior valor preditivo (OR) de HTA. Os indivíduos com menos de 4 alelos de risco têm um OR de 0,38. À medida que o número de alelos aumenta, há um crescimento do OR, apesar de forma oscilante. A partir do 11º alelo de risco, há um considerável aumento no risco de HTA, com um OR final para as 13 variantes de 1,48. Verifica-se assim uma associação positiva do número de alelos de risco com a HTA.

Atendendo a esta observação, optámos pela realização de dois scores de risco genético (aditivo e multiplicativo) a fim de avaliar o poder preditivo do *score* em relação ao aparecimento de HTA.

### V.3.8.2. Score de risco genético

#### Modelo aditivo

Calculámos o *score* de risco genético aditivo, baseado na adição do número de alelos de risco, individualmente. Posteriormente dividimos os valores do *score* aditivo em quartis no grupo dos casos e dos controlos comparando-os (Figura 18).

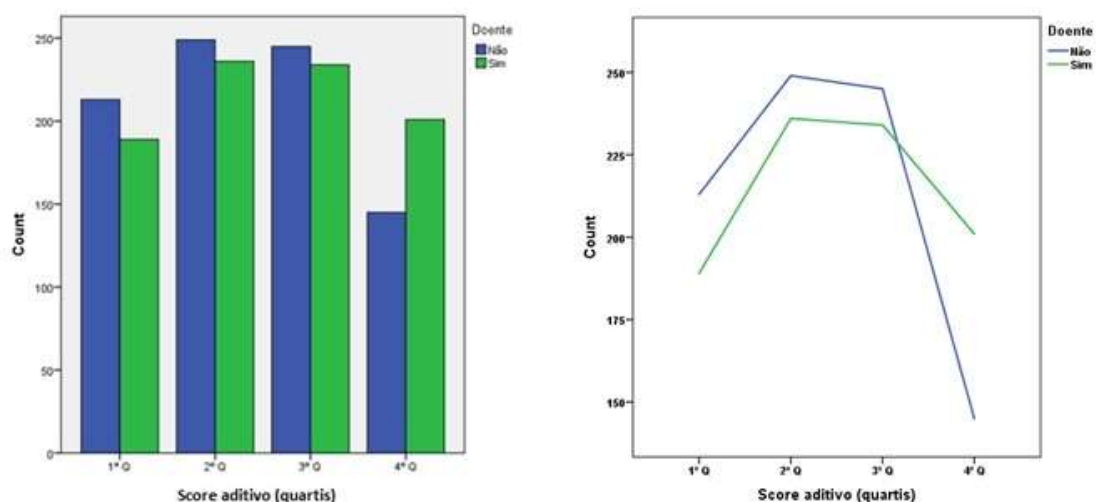


Figura 18 – Distribuição dos alelos de risco nos casos e controlos no *score* de risco aditivo

**Tabela 44 – Score de risco aditivo em quartis**

| SRGa | Total<br>(n=1712) | Casos<br>(n=860) | Controlos<br>(n=852) | Valor p      |
|------|-------------------|------------------|----------------------|--------------|
| 1º Q | 402 (23,5)        | 189 (22)         | 213 (25)             | 0,140        |
| 2º Q | 485 (28,3)        | 236 (27,4)       | 249 (29,2)           | 0,413        |
| 3º Q | 479 (28)          | 234 (27,2)       | 245 (28,8)           | 0,476        |
| 4º Q | 346 (20,2)        | 201 (23,4)       | 145 (17)             | <b>0,001</b> |

SRGA – Score de risco genético aditivo; Q – Quartil; Estatisticamente significativo para  $p < 0,05$ .

Como podemos ver pela Figura 18 e Tabela 44, averiguamos que no 1º quartil do score existiam mais controlos (25%) do que casos (22%) sem significado estatístico, em oposição ao 4º quartil onde surgem mais casos (23,4%) do que controlos (17%) ( $p=0,001$ ).

**Tabela 45 – Comparação do 4º quartil do score com o 1º quartil**

| SRGa | Casos<br>(n=860) | Controlos<br>(n=852) | OR (IC 95%)           | Valor p      |
|------|------------------|----------------------|-----------------------|--------------|
| 1º Q | 189 (22)         | 213 (25)             | 1,562 (1,169 – 2,087) | <b>0,002</b> |
| 4º Q | 201 (23,4)       | 145 (17)             |                       |              |

SRGA – Score de risco genético aditivo; Q – Quartil; OR – Odds ratio; IC – Intervalo de confiança. Estatisticamente significativo para  $p < 0,05$ .

Com o Score genético aditivo em quartis e considerando o 1º quartil como classe de referência, comparamos o 4º quartil com o 1º, em termos de aparecimento de HTA. Podemos observar que os indivíduos do 4º quartil do SRGa têm maior risco de HTA do que os do 1º Quartil (OR=1,562) e com significância estatística ( $p=0,002$ ).

### Modelo Multiplicativo

Dividimos os valores do SRGm em quartis no grupo dos casos e dos controlos e comparámo-los.

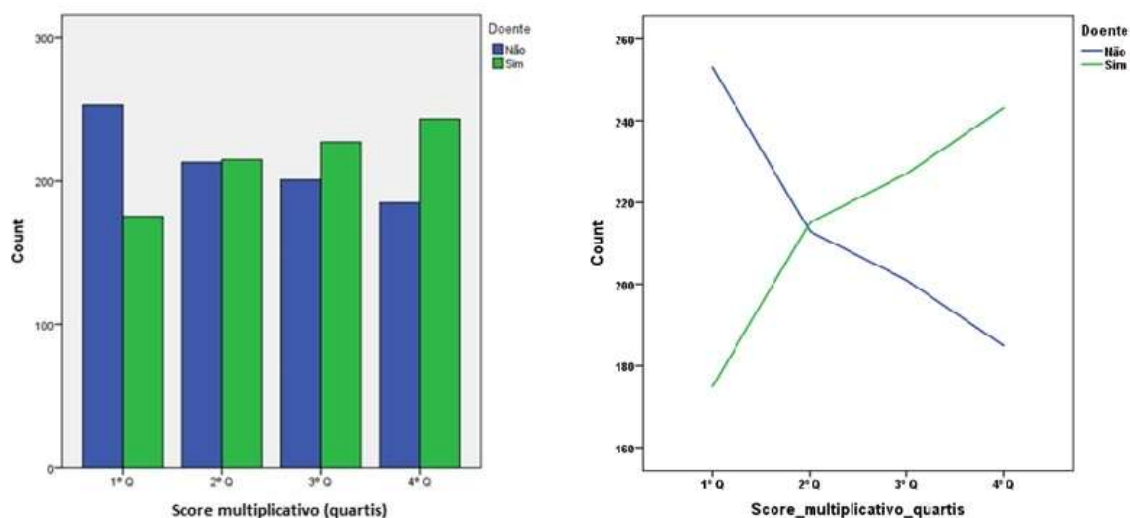


Figura 19 – Distribuição dos alelos de risco nos casos e controlos no modelo de *score* de risco multiplicativo

Tabela 46 – *Score* de risco multiplicativo em quartis

| SRGm | Total<br>(n=1712) | Casos<br>(n=860) | Controlos<br>(n=852) | Valor p           |
|------|-------------------|------------------|----------------------|-------------------|
| 1º Q | 428 (25)          | 175 (20,3)       | 253 (29,7)           | <b>&lt;0,0001</b> |
| 2º Q | 428 (25)          | 215 (25)         | 213 (25)             | 1,000             |
| 3º Q | 428 (25)          | 227 (26,4)       | 201 (23,6)           | 0,180             |
| 4º Q | 428 (25)          | 243 (28,3)       | 185 (21,7)           | <b>0,002</b>      |

SRGM – *Score* de risco genético multiplicativo; Q – Quartil; Estatisticamente significativo para  $p < 0,05$ .

Como mostra a Tabela 46, no 1º quartil há mais controlos (29,7%) do que casos (20,3%) com significância estatística ( $p < 0,0001$ ), e o oposto observa-se no 4º quartil, pois temos mais casos (28,3%) do que controlos (21,7%), também com significância estatística ( $p = 0,002$ ).

Tabela 47 – Comparação do 4º quartil do *score* com o 1º quartil

| SRGm | Casos<br>(n=860) | Controlos<br>(n=852) | OR (IC 95%)           | Valor p           |
|------|------------------|----------------------|-----------------------|-------------------|
| 1º Q | 175 (20,3)       | 253 (29,7)           | 1,899 (1,448 – 2,491) | <b>&lt;0,0001</b> |
| 4º Q | 243 (28,3)       | 185 (21,7)           |                       |                   |

SRGM – *Score* de risco genético multiplicativo; Q – Quartil; OR – Odds ratio; IC – Intervalo de confiança. Estatisticamente significativo para  $p < 0,05$ .

À semelhança do efetuado para o *score* aditivo, foi usada a mesma metodologia para o *Score* genético multiplicativo, tendo sido dividido em quartis e considerado o 1º quartil como classe de referência. Comparámos o 1º com o 4º quartil, em termos de aparecimento de HTA. Foi verificado que os indivíduos do 4º quartil do SRGm têm maior risco de HTA do que os do 1º quartil e com (OR=1,899) e com significância estatística ( $p<0,0001$ ).

### Distribuição dos dois scores por medianas

Foi efetuada a distribuição dos dois scores na população tendo-se verificado que mediana nos casos é maior do que nos controlos.

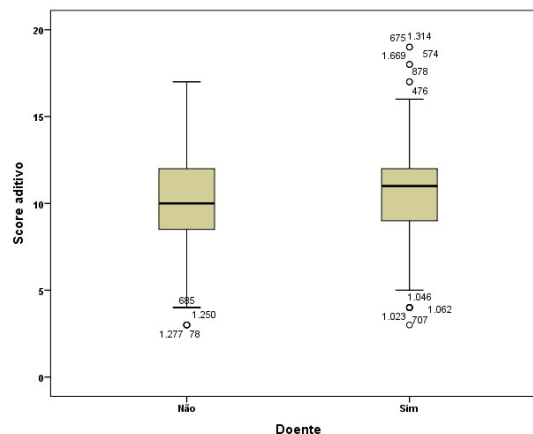


Figura 20 – Distribuição do Score de risco aditivo na população caso/controlo

A mediana está representada dentro da caixa de bigodes, verificando-se que no *score* aditivo é superior nos casos do que nos controlos.



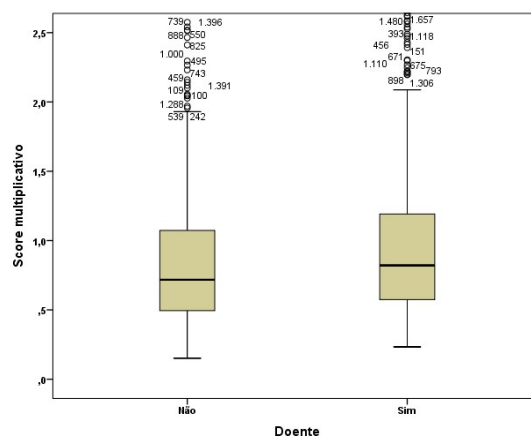


Figura 21 – Distribuição do *Score* de risco multiplicativo na população caso/controlo

O mesmo se verifica no *score* multiplicativo, em que a mediana nos casos é maior do que nos controlos.

### V.3.8.3. Comparação dos dois scores (aditivo e multiplicativo)

Tabela 48 – Risco preditivo de HTA para o SRGa e SRGm

|      | Odds ratio<br>(IC 95%) | Valor p |
|------|------------------------|---------|
| SRGa | 1,069 (1,030 – 1,109)  | <0,0001 |
| SRGm | 1,592 (1,330 – 1,905)  | <0,0001 |

IC – Intervalo de confiança; Estatisticamente significativo para  $p < 0,05$ .

Após o cálculo dos dois modelos de *Score* (SRGm e SRGa) e da comprovação que os dois modelos se associam de forma significativa e independente com a HTA, é necessário comparar os dois modelos no sentido de avaliar qual deles tem maior capacidade preditiva de HTA.

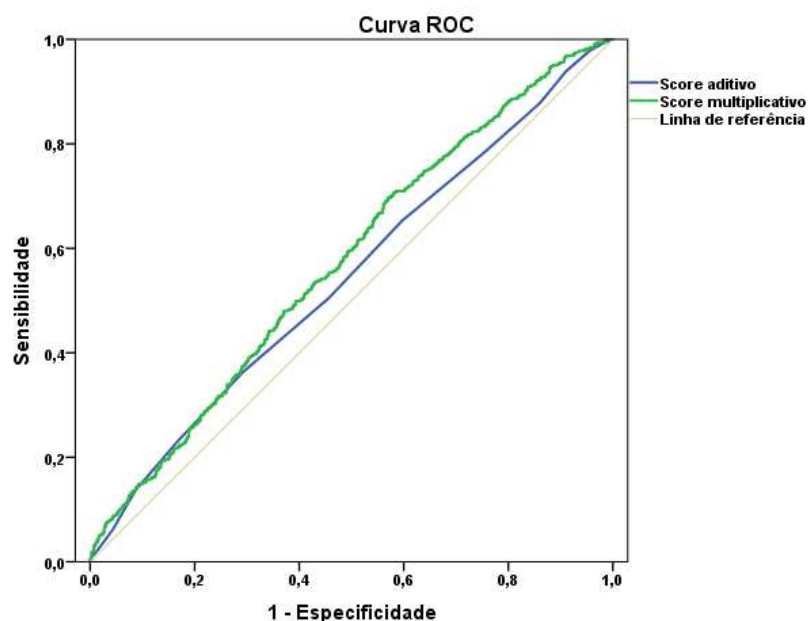


Figura 22 – Capacidade preditiva de HTA nos dois modelos de Score e sua comparação.

A capacidade preditiva de cada modelo de Score, expressa sob a curva AUC, foi significativa nos dois modelos de score. No entanto o SRGm apresentou melhor capacidade preditora (AUC 0,57) para a ocorrência de HTA, tendo um comportamento equilibrado em termos de sensibilidade (69,5%) e especificidade (43,1%) (Figura 22 e Tabela 49). Quando comparámos pelo teste de Delong as duas AUCs dos modelos SRGm e SRGa, podemos provar que houve diferença significativa entre as duas curvas ( $p=0,006$ ).

Globalmente o score de risco multiplicativo apresentou maior sensibilidade e melhor poder preditivo (AUC 0,57) positivo para a ocorrência de HTA.

Tabela 49 – Capacidade preditiva de HTA nos dois modelos de Score e sua comparação

| Scores | AUC (IC 95%)          | Sensib. (%) | Especif. (%) | VPP  | VPN  | Teste Delong (p) |
|--------|-----------------------|-------------|--------------|------|------|------------------|
| SRGA   | 0,544 (0,520 – 0,568) | 36,4        | 70,7         | 1,24 | 0,90 | <b>0,006</b>     |
| SRGM   | 0,574 (0,551 – 0,598) | 69,5        | 43,1         | 1,22 | 0,71 |                  |

SRGA – Score de risco genético aditivo; SRGM – Score de risco genético multiplicativo; IC – Intervalo de confiança; AUC – Area under the curve; Sensib. – Sensibilidade; Especif. – Especificidade; VPP – Valor preditivo positivo; VPN – Valor preditivo negativo; Estatisticamente significativo para  $p<0,05$ .

#### V.3.8.4. Valor preditivo do score genético

Tabela 50 – Análise multivariada de todos os FR tradicionais e o score multiplicativo.

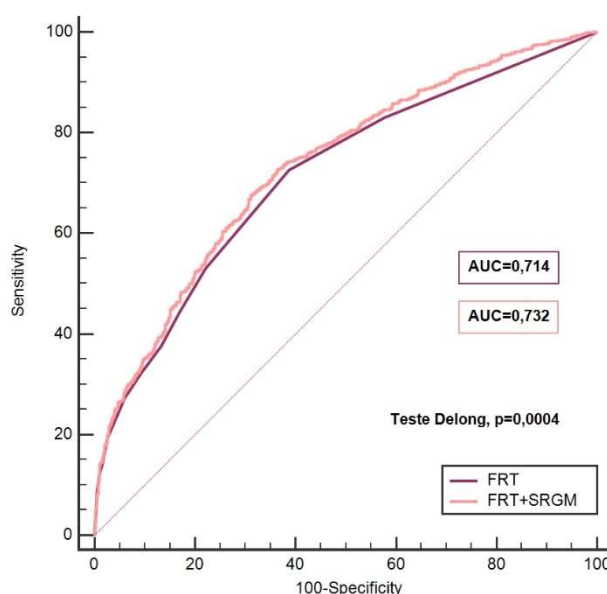
| Variáveis    | B      | E.P.  | Wald    | gl | Odds ratio (IC 95%)   | Valor p           |
|--------------|--------|-------|---------|----|-----------------------|-------------------|
| Abuso álcool | 0,299  | 0,115 | 6,782   | 1  | 1,349 (1,077 – 1,689) | <b>0,009</b>      |
| Obesidade    | 1,098  | 0,126 | 75,956  | 1  | 2,999 (2,343 – 3,839) | <b>&lt;0,0001</b> |
| Diabetes     | 1,431  | 0,195 | 53,971  | 1  | 4,184 (2,856 – 6,130) | <b>&lt;0,0001</b> |
| HTA familiar | 1,030  | 0,112 | 85,083  | 1  | 2,800 (2,250 – 3,485) | <b>&lt;0,0001</b> |
| SRGM         | 0,491  | 0,097 | 25,639  | 1  | 1,634 (1,351 – 1,976) | <b>&lt;0,0001</b> |
| Constante    | -1,329 | 0,124 | 114,348 | 1  | 0,265                 | <b>&lt;0,0001</b> |

*\*Método Forward Wald (SPSS vs. 19.0) em que saiu da equação a variável Sedentarismo. B – Coeficiente de Beta; E.P. – Erro padrão; gl – graus de liberdade; IC – Intervalo de confiança; SRGM – Score de risco genético multiplicativo. Estatisticamente significativo para  $p < 0.05$ .*

Realizada uma análise multivariada com todos os FRT estudados e o score multiplicativo para averiguar quais as variáveis que influenciavam de forma significativa e independente o aparecimento de HTA. O score multiplicativo teve força suficiente para se manter na equação e associar-se de forma significativa e independente com a HTA (OR 1,634;  $p < 0,0001$ ). A diabetes e a obesidade foram as que tiveram maior força de associação (OR 4,184;  $p < 0,0001$  e 2,999;  $p < 0,0001$ , respetivamente). Todas as variáveis estudadas permaneceram na equação exceto o sedentarismo.

Houve boa calibração do modelo da regressão logística, confirmado pelo teste de *Hosmer-Lemeshow* ( $p = 0,225$ ).

As análises do ajuste e calibração do modelo multivariado cumpriram os pressupostos.



**Figura 23 – Curvas ROC e respectivas AUC para os fatores de risco tradicionais de HTA (FRT) e dos FRT + SGm**

Procurámos também, avaliar o poder preditivo dos FRT no aparecimento da HTA e posteriormente, comparámo-lo com o poder preditivo dos FRT associados ao score genético multiplicativo (SGRm).

Calculámos duas curvas ROC e suas respectivas AUC's para avaliar a capacidade preditora de HTA, uma para os FRT e outra para os FRT associados ao SGRm. Os FRT apresentam uma curva basal com AUC de 0,714, havendo uma elevação significativa, após a inclusão do SGRm para 0,732. Feito a comparação das AUC's pelo Teste Delong, observamos que o incremento da área sob a curva, com adição do SGRm, aos FRT, tem significância estatística ( $p=0,0004$ ).

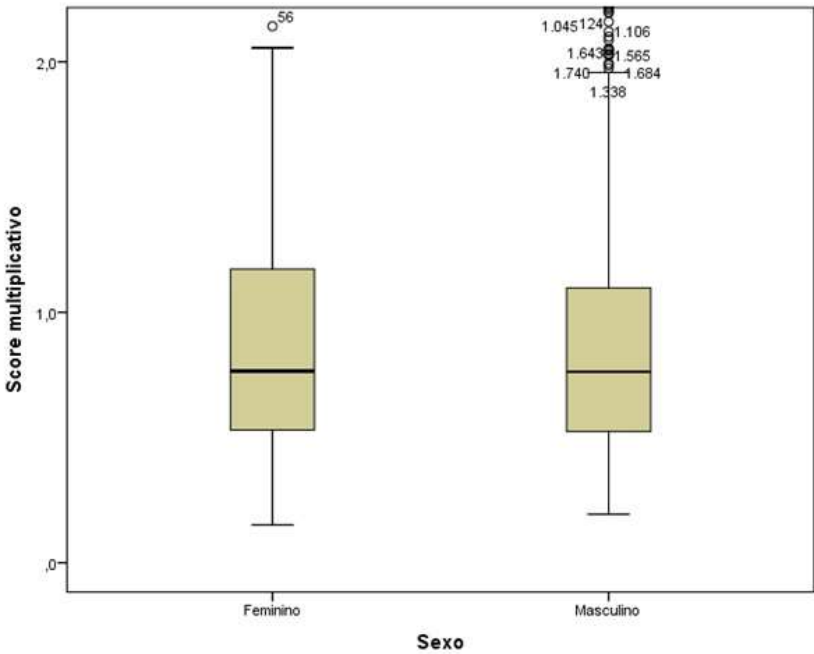
**Tabela 51 – Curvas ROC e respectivas AUC para os fatores de risco tradicionais de HTA (FRT) e dos FRT + SGRm**

| Modelos  | AUC<br>(IC 95%)       | Sensib.<br>(%) | Especif.<br>(%) | VPP  | VPN  | Teste<br>Delong<br>(p) |
|----------|-----------------------|----------------|-----------------|------|------|------------------------|
| FRT      | 0,714 (0,692 – 0,736) | 72,7           | 61,3            | 1,88 | 0,45 | <b>0,0004</b>          |
| FRT+SGRm | 0,732 (0,710 – 0,753) | 67,6           | 68,8            | 2,16 | 0,47 |                        |

*FRT – Factores de risco tradicionais; SGRm – Score de risco genético multiplicativo; IC – Intervalo de confiança; AUC – Area under the curve; Sensib. – Sensibilidade; Especif. – Especificidade; Estatisticamente significativo para  $p<0,05$ .*

Quando são associados aos FRT, o SRGm, há aumento do poder preditivo do modelo, devendo-se a uma melhoria da especificidade (de 61,3% para 68,8%), com redução da sensibilidade (de 72,7% para 67,6%) e com significância estatística ( $p=0,0003$ ).

**Estudo do *score* de risco consoante o género**



**Figura 24 – Distribuição do SRGm no género feminino e masculino – mediana**

**Tabela 52 – Distribuição do SRGm no género feminino e masculino - mediana**

|      | Sexo                 |                      | Valor p |
|------|----------------------|----------------------|---------|
|      | Feminino<br>(n=839)  | Masculino<br>(n=873) |         |
| SRGM | 0,77<br>(0,15 – 4,5) | 0,76<br>(0,19 – 6,7) | 0,447   |

*SRGM – Score de risco genético multiplicativo; Valores expressos pela mediana (mínimo - máximo); Estatisticamente significativo para  $p<0,05$ .*

Na Figura 24 pelas caixas de bigodes e na Tabela 52 podemos observar que a mediana do SRGm no sexo feminino é ligeiramente superior à do sexo masculino mas sem significância estatística ( $p=0,447$ ).

## Valor preditivo adicional do score genético em relação aos fatores de risco de HTA no género masculino

**Tabela 53 – Análise multivariada de todos os FR tradicionais e o score multiplicativo no género masculino.**

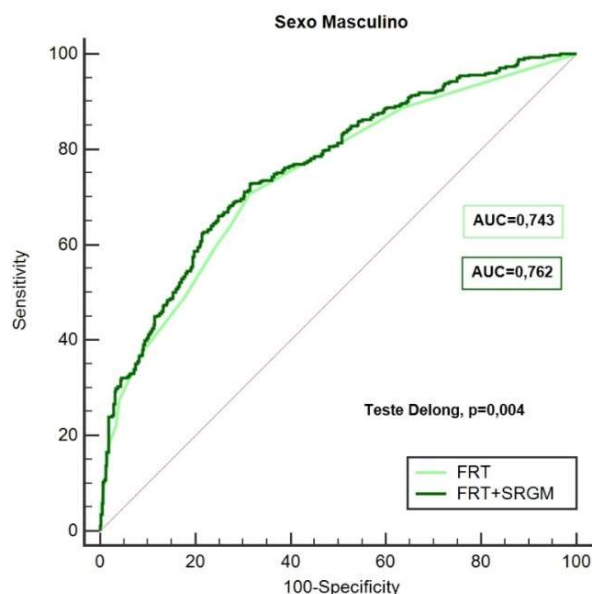
| Variáveis    | B      | E.P.  | Wald   | gl | Odds ratio (IC 95%)   | Valor p           |
|--------------|--------|-------|--------|----|-----------------------|-------------------|
| Abuso álcool | 0,362  | 0,153 | 5,588  | 1  | 1,437 (1,064 – 1,940) | <b>0,018</b>      |
| Diabetes     | 1,453  | 0,247 | 34,695 | 1  | 4,275 (2,636 – 6,933) | <b>&lt;0,0001</b> |
| Obesidade    | 1,166  | 0,179 | 42,275 | 1  | 3,211 (2,259 – 4,564) | <b>&lt;0,0001</b> |
| HTA familiar | 1,465  | 0,181 | 65,258 | 1  | 4,327 (3,033 – 6,173) | <b>&lt;0,0001</b> |
| SRGM         | 0,556  | 0,140 | 15,767 | 1  | 1,744 (1,325 – 2,294) | <b>&lt;0,0001</b> |
| Constante    | -1,459 | 0,186 | 61,771 | 1  | 0,233                 | <b>&lt;0,0001</b> |

*\*Método Forward Wald (SPSS vs. 19.0) em que saiu da equação a variável Sedentarismo. B – Coeficiente de Beta; E.P. – Erro padrão; gl – graus de liberdade; IC – Intervalo de confiança; HTA – Hipertensão arterial; SRGM – Score de risco genético multiplicativo. Estatisticamente significativo para  $p < 0.05$ .*

Recorrendo a uma análise de regressão logística, avaliamos os FRT e o score multiplicativo a fim de identificar quais as variáveis que influenciavam de forma significativa e independente o aparecimento de HTA no género masculino. Assim como na população total, o score multiplicativo manteve-se na equação e associou-se de forma significativa e independente com a HTA (OR 1,744;  $p < 0,0001$ ). A variável com maior força de associação foi a História familiar (OR 4,327;  $p < 0,0001$ ), seguida da diabetes e da obesidade foram as que tiveram maior força de associação (OR de 4,275;  $p < 0,0001$  e 3,211;  $p < 0,0001$ , respetivamente). Todas as variáveis estudadas permaneceram na equação exceto o sedentarismo.

Houve boa calibração do modelo da regressão logística, confirmado pelo teste de Hosmer-Lemeshow ( $p = 0,514$ ).

As análises do ajuste e calibração do modelo multivariado cumpriram os pressupostos.



**Figura 25 – Curvas ROC e respectivas AUC para os fatores de risco tradicionais de HTA (FRT) e dos FRT + SRGm no subgrupo do sexo masculino.**

No subgrupo do sexo masculino calculámos o poder preditivo dos FRT de HTA, através de uma curva de ROC e sua respetiva AUC (AUC 0,743). Realizada nova curva de ROC e calculada a respetiva AUC, para os FRT associados ao SRGm (AUC 0,762). Feito a comparação das AUC's das pelo Teste Delong, observamos que o incremento da área sob a curva com adição do SRGm aos FRT tem significância estatística ( $p=0,004$ ). Também assim como no grupo total, no subgrupo do sexo masculino o SRGm quando associado aos FRT aumenta o valor preditivo de HTA.

**Tabela 54 – Curvas ROC e respectivas AUC para os fatores de risco tradicionais de HTA (FRT) e dos FRT + SGm no subgrupo do sexo masculino.**

| Modelos  | AUC<br>(IC 95%)       | Sensib.<br>(%) | Especif.<br>(%) | VPP  | VPN  | Teste<br>Delong<br>(p) |
|----------|-----------------------|----------------|-----------------|------|------|------------------------|
| FRT      | 0,743 (0,713 – 0,772) | 70,7           | 68,7            | 2,26 | 0,43 | <b>0,004</b>           |
| FRT+SRGm | 0,762 (0,732 – 0,790) | 72,7           | 68,4            | 2,30 | 0,40 |                        |

*FRT – Factores de risco tradicionais; SRGM – Score de risco genético multiplicativo; IC – Intervalo de confiança; AUC – Area under the curve; Sensib. – Sensibilidade; Especif. – Especificidade; VPP – Valor preditivo positivo; VPN – Valor preditivo negativo; Estatisticamente significativo para  $p<0,05$ .*

No grupo do sexo masculino, a inclusão do SRGm à curva basal dos FRT, há um aumento do poder preditivo do modelo, à custa de uma melhoria da sensibilidade (de 70,7% para

72,7%) e com ligeira redução da especificidade (de 68,7% para 68,4%) e com significância estatística através do teste Delong ( $p=0,004$ ).

### Valor preditivo adicional do score genético em relação aos fatores de risco de HTA no género feminino

**Tabela 55 – Análise multivariada de todos os FR tradicionais e o score multiplicativo no género feminino.**

| Variáveis    | B      | E.P   | Wald   | gl | Odds ratio (IC 95%)   | Valor p |
|--------------|--------|-------|--------|----|-----------------------|---------|
| Diabetes     | 1,437  | 0,328 | 19,189 | 1  | 4,210 (2,213 – 8,008) | <0,0001 |
| Obesidade    | 1,019  | 0,179 | 32,442 | 1  | 2,769 (1,951 – 3,932) | <0,0001 |
| HTA familiar | 0,779  | 0,149 | 27,418 | 1  | 2,179 (1,628 – 2,916) | <0,0001 |
| SRGM         | 0,436  | 0,138 | 9,943  | 1  | 1,547 (1,179 – 2,028) | 0,002   |
| Constante    | -1,200 | 0,170 | 49,574 | 1  | 0,301                 | <0,0001 |

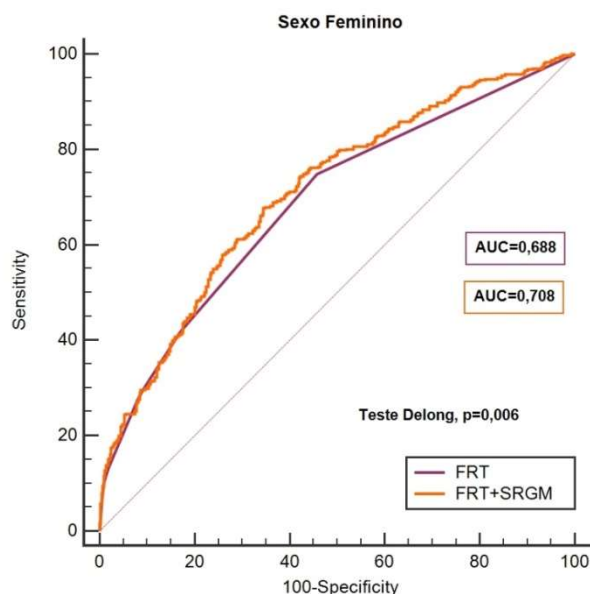
*\*Método Forward Wald (SPSS vs. 19.0) em que saiu da equação a variável Sedentarismo. B – Coeficiente de Beta; E.P. – Erro padrão; gl – graus de liberdade; IC – Intervalo de confiança; HTA – Hipertensão arterial; SRGM – Score de risco genético multiplicativo. Estatisticamente significativo para  $p<0,05$ .*

Usando uma análise de regressão logística, com os FRT estudados e o score multiplicativo avaliámos quais as variáveis que influenciavam de forma significativa e independente o aparecimento de HTA no género feminino. O score multiplicativo associou-se de forma significativa e independente com a HTA (OR 1,547;  $p=0,002$ ). A diabetes e a obesidade também associaram-se com a HTA com OR de 4,210;  $p<0,0001$  e de 2,769;  $p<0,0001$  e com significância estatística. De todas as variáveis estudadas a que não permaneceu na equação foi o sedentarismo.

Houve boa calibração do modelo da regressão logística, confirmado pelo teste de *Hosmer-Lemeshow* ( $p=0,259$ ).

As análises do ajuste e calibração do modelo multivariado cumpriram os pressupostos.





**Figura 26 – Curvas ROC e respectivas AUC para os fatores de risco tradicionais de HTA (FRT) e dos FRT + SGm no grupo do sexo feminino.**

À semelhança do que fizemos para o grupo total e para o subgrupo do género masculino, também no subgrupo do género feminino, avaliámos se havia valor preditivo adicional do SRGm em relação aos FRT no aparecimento de HTA no género feminino. Calculámos também o poder preditivo dos FRT de HTA, através de uma curva de ROC e sua respetiva AUC (AUC 0,688). Realizada nova curva de ROC e calculada a respetiva AUC, para os FRT associados ao SRGm (AUC 0,708). Feito a comparação das AUCs das pelo Teste Delong, há incremento da área sob a curva, aquando da adição do SRGm aos FRT e com significância estatística ( $p=0,006$ ). Também neste subgrupo do sexo feminino, o SRGm associado aos FRT aumenta o valor preditivo de HTA.

**Tabela 56 – Curvas ROC e respectivas AUC para os fatores de risco tradicionais de HTA (FRT) e dos FRT + SGm no grupo do sexo feminino.**

| Modelos  | AUC<br>(IC 95%)       | Sensib.<br>(%) | Especif.<br>(%) | VPP  | VPN  | Teste<br>Delong<br>(p) |
|----------|-----------------------|----------------|-----------------|------|------|------------------------|
| FRT      | 0,688 (0,655 – 0,719) | 74,9           | 54,2            | 1,64 | 0,46 | <b>0,006</b>           |
| FRT+SRGM | 0,708 (0,676 – 0,739) | 67,7           | 65,4            | 1,96 | 0,49 |                        |

FRT – Factores de risco tradicionais; SRGm – Score de risco genético multiplicativo; IC – Intervalo de confiança; AUC – Area under the curve; Sensib. – Sensibilidade; Especif. – Especificidade; VPP – Valor preditivo positivo; VPN – Valor preditivo negativo; Estatisticamente significativo para  $p<0,05$ .

No grupo do sexo feminino, também, com a inclusão do SRGm à curva basal dos FRT, há um aumento do poder preditor do modelo, havendo, no entanto, redução da sensibilidade (de 74,9% para 67,7%), mas com aumento da especificidade (de 54,2% para 65,4%) e com significância estatística ( $p=0,006$ ).

Assim como no grupo total e no grupo do sexo masculino, também no grupo do sexo feminino, o modelo final (FRT+ 5 genes), tem melhor poder preditivo de HTA, com especificidade de 65,4% e sensibilidade de 67,7% ( $p=0,006$ ).

**CAPÍTULO V**  
**DISCUSSÃO GERAL**



## **VI. DISCUSSÃO GERAL**

### **INTRODUÇÃO**

#### **VI.1. Tipo de estudo**

Optamos por fazer um estudo caso - controlo em vez de um estudo prospetivo, por ser mais rápido, barato e de fácil execução, além do que é adequado para a avaliação de múltiplas variáveis com possível associação, a uma determinada doença.

Apesar das vantagens do estudo caso-controlo, surgem algumas limitações que lhe são inerentes e que tentámos ultrapassar.

O estudo caso-controlo é um estudo retrospectivo, pelo que os dados clínicos são essencialmente indagados aos participantes assim, uma das limitações destes estudos relaciona-se com erros de memória dos doentes e dos controlos. Tentámos ultrapassar esta limitação, usando um inquérito em relação aos dados da história pregressa dos participantes e à história familiar. Este inquérito foi efetuado na 1ª consulta e repetido (para confirmação) em consultas subsequentes.

O protocolo do estudo foi igual para os casos e controlos, de modo a serem mais facilmente comparáveis.

O fato de ser usado um protocolo igual para os casos e controlos em que ambos respondem às mesmas questões diminui outra limitação, muitas vezes referida, o enviesamento do entrevistador. Também para minimizar esta limitação o inquérito foi feito durante a consulta médica, por um médico com mais de 5 anos de experiência clínica. Sendo um médico com experiência clínica a realizar a consulta médica, minimiza os erros que possam surgir na colheita dos dados, resultantes da observação clínica nomeadamente, peso, altura, frequência cardíaca, pressão arterial, etc.

Em relação aos dados laboratoriais não há grande probabilidade de erro visto serem feitos no mesmo laboratório – SESARAM EPE, tendo este laboratório certificado de Qualidade. Também em relação às análises genéticas, foram efetuadas no Laboratório

de Genética da Universidade da Madeira, tendo sido realizado controlo de qualidade a todas as técnicas de genotipagem, conforme anteriormente referenciado.

A hipertensão arterial sendo uma doença crónica, per si, não apresenta grande mortalidade e devido a este aspeto, não há grande enviesamento por auto-seleção relacionada com o óbito dos doentes.

Procurámos que os casos e controlos fossem em numero semelhante e foi realizado o emparelhamento entre casos e controlos, em relação à idade e sexo para diminuir os fatores de confusão.

Podemos concluir que um estudo caso-controlo apesar das limitações que comporta, é adequado para estudar a associação do perfil genético com a HTA.

## **VI.2. Metodologia**

### **VI.2.1. Seleção dos controlos**

Os controlos foram recrutados de forma aleatória dos cadernos eleitorais da RAM, procurando que vivessem na mesma região geográfica que os casos, de forma a que eventuais variações geográficas não interferiram nos resultados do estudo. Também derivavam de populações com idênticas condições culturais e socio-económicas, de modo a que houvesse comparabilidade com o grupo dos casos.

Contataram-se os indivíduos (controlos) telefonicamente, posteriormente foram avaliados em consulta médica e só depois da confirmação da normalidade da sua PA é que eram incluídos no estudo.

Optamos por selecionar os controlos telefonicamente e não pelos ficheiros dos médicos assistentes, pelo fato dos indivíduos que recorrem periodicamente ao médico, mesmo saudáveis, estão mais preocupados com a sua saúde e têm menos fatores de risco dependentes dos seus comportamentos.

Os controlos foram selecionados e emparelhados de acordo com o grupo etário e género, à medida que foram recrutados os doentes, permitindo que a amostra não fosse enviesada.

No entanto uma limitação que não foi possível ultrapassar, refere-se ao fato da HTA ser uma doença com desenvolvimento mais tardio e haver alguns controlos jovens que poderão mais tarde desenvolver a doença. Obviamente o *background* genético hipertensivo já se encontrava presente, nestes doentes. Esta questão, no entanto, não deverá desvalorizar o estudo.

#### **VI.2.2. Seleção dos casos**

Em relação à seleção dos casos tivemos uma metodologia o mais exaustiva possível. Pedimos aos médicos do Centros de Saúde e aos médicos de Medicina Interna, que nos enviassem, das suas listas, indivíduos hipertensos a fim de incluir no nosso estudo.

Os casos não foram selecionados em ambiente hospitalar, visto estes indivíduos sob *stress* poderem apresentar valores da PA mais elevados e não serem verdadeiros hipertensos.

Todos estes doentes foram observados em consulta médica na Unidade de Investigação e somente após a confirmação da sua patologia (HTA) é que eram incluídos no estudo.

Esta metodologia usada na seleção dos casos e controlos, foi uma mais valia para o nosso estudo, pois só foram incluídos indivíduos, após confirmação médica e não por simples afirmação verbal dos indivíduos.

#### **VI.2.3. Critérios de inclusão e exclusão**

Com o fim de cumprir os objetivos do nosso estudo, implementamos uma metodologia mais precisa, de modo a evitar a desvirtuação e representatividade dos resultados.

Como critério de inclusão dos casos usámos as *Guidelines* europeias de HTA (ESH) que definem os critérios de HTA, garantindo assim o fenótipo hipertensivo.

Foram excluídos os indivíduos a fazer medicação para outras patologias o que pode afetar a pressão arterial. Foram também excluídos os mais novos, com menos de 35 anos, pois muitas vezes a HTA nestes indivíduos é secundária assim como os mais velhos com idade superior a 70 anos, que apresentam muitas co-morbilidades associadas e estão frequentemente medicados com fármacos que podem interferem na PA.

Em relação aos controlos, foram rejeitados aqueles que tivessem tido alguma vez HTA ou que cumprissem medicação que interferisse na PA.

Uma mais valia do nosso estudo foi o fato de serem selecionados indivíduos dos vários Centros de Saúde da RAM e outros das listas eleitorais, permitindo assim que a nossa amostra englobasse população de toda a RAM - Ilha da Madeira e do Porto Santo.

Concluímos deste modo que a população de casos e controlos selecionada para o nosso estudo é válida e permite retirar conclusões robustas e seguras.

#### **VI.2.4. Definição das variáveis estudadas e critérios utilizados na caraterização da população**

Como se depreende para este tipo de estudo é fundamental avaliar os fatores de risco tradicionais de HTA e de DCV, dado esta estar intimamente ligada à HTA. A HTA é um dos fatores mais importantes de DCV que é uma das principais causas de morbilidade e mortalidade nos países desenvolvidos e em vias de desenvolvimento.

Para saber qual o impacto da genética no desenvolvimento de HTA, é importante previamente avaliar os fatores de risco clássicos de HTA e determinar o seu poder preditivo, na progressão desta patologia. Este aspeto permite avaliar o valor acrescentado pela genética em relação aos FRT na predição de HTA.

Incluímos assim fatores modificáveis e não modificáveis de HTA e de DCV.

Sendo assim avaliámos e quantificamos os hábitos tabágicos, alcoólicos e as caraterísticas antropométricas na nossa população. As variáveis diabetes, obesidade e dislipidemia foram definidas por categorias de risco, dicotómicas. Para esse efeito, foram



introduzidos valores – limite (*cut-points*), imanados da Sociedade Europeia de Hipertensão (ESH) e de Cardiologia (ESC).

Em termos analíticos também incluímos o hemograma com plaquetas, variáveis bioquímicas para determinação da função renal e ficha lipídica assim como outras variáveis nomeadamente a glicose, o Fibrinogénio e a PCR (as).

Não descuramos inquirir os participantes sobre antecedentes pessoais de DCV e história familiar de HTA ou de DCV.

A todos os indivíduos foi realizado um eletrocardiograma que permitiu excluir HVE ou doença das artérias coronárias.

A determinação da VOP a fim de avaliar a rigidez vascular também foi efetuada a todos os participantes utilizando o método *COMPLIOR*. Dos diversos métodos de avaliação da rigidez arterial a velocidade da onda de pulso (VOP) carotídeo-femoral é considerada o método *gold standard*, devido à sua precisão e facilidade de execução <sup>(217)</sup>.

Também, e como seria inerente ao estudo dos Hipertensos, é fundamental avaliar as LOA da HTA. Com essa finalidade foi efetuado ecocardiograma, retinografia e colheita de urina de 24h para determinar a taxa de filtração glomerular e sódio urinário.

Consideramos ter conseguido, com esta avaliação, uma adequada caraterização da nossa população a fim de pesquisar as variantes preditoras de HTA.

### **VI.3. Caraterização da população**

#### **VI.3.1. Caraterísticas basais, clínicas e bioquímicas**

Em relação à caraterização da nossa população (Tabela 4) em termos de risco CV, na globalidade, os hipertensos tinham um perfil de risco cardiovascular mais marcado do que os controlos.

No grupo de hipertensos havia maior percentagem de indivíduos sedentários e com maior abuso de álcool, o que está de acordo com a literatura, que associa estes dois fatores de risco a maior risco de HTA.

Em relação ao tabagismo, no grupo dos controlos havia maior percentagem de indivíduos com hábitos tabágicos em comparação com o grupo dos hipertensos. Isto provavelmente deve-se ao fato dos hipertensos já estarem a ser seguidos em consultas médicas e em abordagem geral do risco cardiovascular, muitos deixaram de fumar. Embora com menor percentagem de fumadores, os que o faziam consumiam um nº mais elevado de cigarros /dia (> 20 cigarros /dia).

Salienta-se também que o grupo dos Hipertensos tem valores médios de PAS e de PAD mais elevados do que no grupo dos controlos e com significância estatística ( $p < 0,0001$ ). É previsível o fato do grupo dos Hipertensos apresentar valores médios PAS e PAD mais elevados do que no grupo dos controlos, porque os nossos hipertensos não apresentam um bom controlo tensional. Salienta-se que 103 (12%) deles não têm HTA controlada.

A velocidade de onda de pulso é atualmente um marcador de rigidez arterial e por isso um parâmetro importante na avaliação do risco cardiovascular. Salienta-se que, na nossa população de hipertensos, o valor médio da VOP era superior à dos controlos e que nesse grupo de hipertensos a percentagem de indivíduos com VOP elevada (> 10 m/s) era também superior.

Vários trabalhos da literatura internacional confirmam a sua associação com doença cardiovascular, independentemente dos fatores de risco tradicionais e em várias populações (196). Na presença de HTA, há uma aceleração da rigidez da parede vascular, mesmo em populações com prevalência de aterosclerose baixa. O aumento da rigidez arterial provoca ainda maior elevação dos níveis de PA (<sup>218</sup>).

Destaca-se que no grupo dos hipertensos 2% tinham História pessoal de doença das artérias coronárias (DAC /EAM), 2,8% doença cerebrovascular (AVC/AIT) e no grupo dos controlos 0,1% tinham história pessoal de doença das artérias coronárias (DAC/EAM), 1,1% de doença cerebrovascular (AVC/AIT) o que está de acordo com dados estatísticos da população da Região Autónoma da Madeira (RAM) na qual existe maior incidência de doença cerebrovascular (AVC/AIT) do que DAC/EAM.

No grupo dos Hipertensos, existiam mais indivíduos com história familiar de doença hipertensiva e de DCV em comparação com o dos controlos (47,5% vs. 25,6% e 38,5%

vs. 25,6%), sugerindo assim a importância do componente genético na eclosão destas patologias.

Analicamente em relação ao perfil lipídico (Tabela 5) não havia diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos em relação ao colesterol total e ao LDL – colesterol, em relação às HDL-colesterol os hipertensos tinham valores mais baixos do que os controlos. Estes hipertensos estavam a ser seguidos no médico de família e muito já previamente medicados para a sua dislipidemia.

Em relação ao fibrinogénio (Tabela 5) os hipertensos tinham valores séricos mais elevados do que os controlos e com significância estatística, evidenciando-se o fato do fibrinogénio ser um marcador inflamatório que se associa ao maior risco de eventos vasculares. Este marcador inflamatório também reflete um estado de hipercoagulação que contribui para a progressão da aterosclerose. Alguns trabalhos da literatura internacional, já referenciaram uma associação entre níveis séricos elevados de fibrinogénio e a HTA (<sup>219</sup>).

A PCR (as) também tem valores mais elevados no grupo dos hipertensos o que nos leva a salientar a existência de um componente inflamatório e aterosclerótico nos hipertensos (Tabela 5).

Com o fim de avaliar a função renal, de uma forma precisa, no grupo dos hipertensos foi determinada a clearance da creatinina na urina de 24h. Foi também quantificada a excreção de sódio urinário, com o objetivo de averiguar a ingestão diária de sódio.

### **VI.3.2. Estudo genético**

Grande parte da variabilidade da doença hipertensiva ainda continua por explicar, mas o impacto clínico dos recentes achados dos estudos do GWAS na HTA, mesmo não estando completamente definido, só pelo conhecimento de novas variantes genéticas que nos proporcionou, vai permitir perceber melhor a etiopatogenia desta doença multifatorial. Muitos genes próximos dessas mesmas variantes associadas à HTA, já estão identificados e muitos outros genes e suas variantes poderão ser identificados,

através desta metodologia genética. Curiosamente, na nossa população, as variantes genéticas associadas à HTA, de forma significativa, têm diferentes mecanismos fisiopatológicos, o que poderá sugerir que a etiopatologia da HTA, na nossa população, se deve a mecanismos fisiopatológicos diferentes. Isto não invalida que, em outros estudos, com outras populações, haja um mecanismo fisiopatológico predominante, que se pode sobrepor aos outros e tornar evidente a sua influência na etiologia da HTA.

Foram investigados, no presente estudo, 14 variantes genéticas pertencentes a diferentes sistemas envolvidos na regulação da pressão arterial, Sistema Renina Angiotensina Aldosterona: *ACE* rs4340, *ACE* rs 4343, *AGT* 174 rs4762, *AGT* 235 rs699, *AT1R* rs5186, *CYP 11B2* rs1799998; Sistema Nervoso Simpático Adrenérgico: *ADRB1* rs1801253 e *ADRB2* rs1042713; Balanço do Sódio: *ADD1* rs1801253 *SNN1G* rs5718; Sistema relacionado com Esteroides; *CYP17A1* rs11191548; Variantes que envolvem mecanismos Celulares: *GNB3* rs5443, *ATP2B1* rs2681472 e *SLC4A2* rs2303934 (Tabela 6 e 7).

Destas apenas a *ACE* rs4340, *ACE* 2350 rs4343, *ADRB1* rs1801253, o *ADD1* rs4961 e *GNB3* rs5443 apresentaram associação significativa com a HTA, mas não em todos os modelos genéticos, como já citamos (Tabela 7).

As duas primeiras pertencem ao SRAA e a terceira ao Sistema Nervoso Simpático. A variante genética *ADD1* G460W modula a capacidade global das células epiteliais tubulares para transportar iões, conduzindo a uma atividade aumentada da bomba de  $\text{Na}^+ / \text{K}^+ \text{-ATPase}$  e, portanto, a uma maior reabsorção de sódio no túbulo renal proximal, aumentando, consequentemente, a pressão arterial (<sup>220</sup>).

A variante *GNB3*825T é uma variante truncada de *splice-Gβ3-s* que, sendo uma proteína funcional, provoca uma maior ativação das proteínas G, promovendo melhor sinalização intracelular. A HTA é devida a uma maior sensibilidade às hormonas de pressão vasoativas, que transmitem os seus sinais através de proteínas  $\text{GN}\beta 3$ , levando a maior reatividade vascular (<sup>221</sup>).

Estes mecanismos reguladores da Pressão Arterial e associados a estas variantes genéticas, significativas, poderão representar uma parte importante da estrutura genética que controla a PA, na nossa população.

O poder de associação, com a HTA, das variantes genéticas na população do presente estudo é semelhante ao descrito na literatura, destacando-se a variante *ADD1* G/W cujo  $OR=2,763$  representa quase o dobro do descrito na literatura. Em virtude de este SNP estar associado a uma maior reabsorção do  $Na^+$  e mostrar maior prevalência do genótipo de risco TT na nossa população hipertensa- 3.5% em relação aos controles- 1,3% ( $p=0,011$ ) podemos deduzir que os mecanismos relacionados com a reabsorção do  $Na^+$  deverão ser considerados na sua etiologia. A variante *GNB3* no modelo dominante, apresenta um poder de associação com HTA  $=1,34$  com um  $p=0,004$  semelhante ao correspondente na literatura (1,33). Também os portadores desta variante genética apresentam maior reatividade vascular e maior reabsorção de  $Na^+$  ao nível do Rim (Tabela 8).

De forma semelhante os mecanismos relacionados com a modulação do SRAA e com o sistema simpático adrenérgico estão balanceados pelas variantes *ACE* rs4340 no modelo alélico com um poder de associação 1,17 ( $p=0,025$ ), ligeiramente superior ao da literatura (1,0), o *ACE* 2350 rs4343 no modelo aditivo com um  $OR$  1,18 ( $p=0,022$ ) valor superior ao existente na literatura (1,06) e o *ADRB1* rs1801253 que mostrou apenas significância no modelo dominante com um  $OR=1,41$  ( $p=0,033$ ), neste caso inferior ao da literatura (1,65) (Tabela 8).

No entanto, devido ao pequeno efeito que cada variante representa no risco de HTA, fomos investigar se a combinação dos efeitos de várias variantes de um único nucleótido (SNP) podia melhorar a previsão do risco. Assim, verificamos que quando agrupávamos as cinco variantes que tinham mostrado significância, a sua capacidade preditiva aumentava significativamente em relação ao valor preditivo de cada uma isolada (Figura 10).

No entanto e apesar de se verificarem incrementos significativos entre as primeiras cinco variantes, a partir deste número começamos a verificar uma certa estabilização que se mantém até à junção da 13ª variante (Figura 11). Não sabemos se a junção de um maior número de polimorfismos significativos iria provocar um aumento do poder preditivo deste modelo e até que limite. Este aspeto representou para nós um desafio que deverá ter continuidade no futuro.

Após análise multivariada corrigida para as 13 variantes genéticas em estudo, apenas mostraram significância, de forma independente, os SNPs ADD1 ( $p=0,018$ ) e o GNB3 ( $p=0,011$ ) (Tabela 9).

Contudo, embora centenas de genes tenham sido identificados através dos estudos de GWAS e tenham produzido alguns resultados interessantes somente 1% da variabilidade de PA, pode ser explicada através dos mesmos (<sup>222</sup>).

Este fato resulta da HTA ser uma doença multigénica e multifatorial e a sua progressão ser afetada também por fatores ambientais. Não há dúvida de que não só os fatores genéticos, mas também os ambientais são muito importantes na regulação e manutenção da pressão arterial. Há evidências crescentes de que interações complexas entre múltiplos genes e múltiplos fatores ambientais desempenham um papel importante na determinação do risco individual de HTA.

### **VI.3.3. Fatores ambientais**

Consideramos como fatores de risco tradicionais a obesidade, sedentarismo, diabetes, consumo de álcool e história familiar de HTA. Destes apenas o sedentarismo não mostrou significância estatística após análise multivariada (Tabela 10).

## **VI.4. Estudo combinado dos fatores genéticos e não genéticos**

### **Associação/Interação**

Nesse sentido e em virtude da HTA apresentar uma forte componente ambiental decidimos investigar, através de um estudo combinado, a associação /interação entre os fatores genéticos e não genéticos.

#### **VI.4.1. Estudo de associação; Fatores genéticos e ambientais**

Na análise multivariada quando se associavam os fatores genéticos e não genéticos apenas se mostraram significativos, na nossa população, os polimorfismos ADD1 ( $p=0,036$ ) e ACE 2350 ( $p=0,035$ ) e os fatores não genética obesidade ( $p<0,0001$ ), diabetes ( $p<0,0001$ ), História familiar de HTA ( $p<0,0001$ ), e o abuso de álcool ( $p=0,007$ ) (Tabela 11).

A capacidade preditiva de HTA através da curva ROC evidenciou haver poder adicional quando aos fatores de risco clássico se somavam os fatores genéticos significativos (Figura 12 e Tabela 12).

#### **VI.4.2. Estudo de interação; gene-gene e gene-ambiente**

Seguidamente fomos investigar se existia interação significativa ente os genes estudados e também entre estes e os fatores ambientais. No primeiro caso não conseguimos identificar nenhum modelo de interação com valor significativo (Tabela 13). No segundo caso o melhor modelo foi o que englobava a diabetes, obesidade e o polimorfismo ADD1 (Tabela 14). A interação significativa entre a variante genética e a diabetes faz todo o sentido pois existe uma ligação grande entre a HTA e a diabetes em virtude de ambos representarem dois dos principais fatores de risco para aterosclerose e suas complicações. Subsiste uma sobreposição importante entre diabetes e HTA, existindo também sobreposições substanciais nos seus mecanismos etiológicos e patológicos (<sup>223</sup>)

No *Hong Kong Study* sobre a Prevalência dos Fatores de Risco Cardiovascular, apenas 42% das pessoas com diabetes eram normotensas e apenas 56% dos indivíduos com HTA apresentavam tolerância normal à glicose (<sup>224</sup>)

Na população dos EUA, a hipertensão ocorre em aproximadamente 30% dos doentes com diabetes tipo 1 e em 50% a 80% dos doentes com diabetes tipo 2. Um estudo

efetuado em uma coorte prospectiva nos Estados Unidos, revelou que a diabetes tipo 2 era quase 2,5 vezes mais provável de se desenvolver em indivíduos com HTA do que em normotensos (<sup>225</sup>).

Percebe-se atualmente que a resistência à insulina, que prevê diabetes tipo 2, também tem um papel importante no desenvolvimento da HTA (<sup>226</sup>).

Na verdade, a HTA e a diabetes partilham caminhos comuns como sejam a obesidade, inflamação, *stress* oxidativo, resistência à insulina e *stress* mental (<sup>227</sup>).

Em estudos anteriores, do nosso grupo, já havíamos investigado a interação positiva entre o polimorfismo ADD1 e a diabetes num modelo estatístico que também englobava a obesidade (<sup>228</sup>).

Em relação à Obesidade não nos surpreende que possa influenciar a progressão para a HTA pois as principais consequências de sobrepeso ou obesidade incluem uma maior prevalência de hipertensão e uma cascata de distúrbios cardio-renais e metabólicos. Estudos em diversas populações em todo o mundo mostraram que a associação entre o IMC e a pressão arterial sistólica e diastólica (BP) é quase linear. Estimativas de risco do *Framingham Heart Study*, por exemplo, sugere que 78% da hipertensão arterial essencial em homens e 65% em mulheres pode ser atribuída ao excesso de peso.

Estudos clínicos indicam que a manutenção de um IMC <25 kg / m<sup>2</sup> é eficaz na prevenção primária da hipertensão e que a perda de peso reduz a PA na maioria dos hipertensos (<sup>229</sup>).

Também na já citada publicação do nosso grupo de investigação (<sup>228</sup>) o melhor modelo de interação gene/ambiente selecionado pelo software MDR tinha sido o que englobava a diabetes e a obesidade além da variante ADD1.



## **VI.5. Estudo genético nos subgrupos**

### **VI.5.1. Género Masculino**

No género masculino apenas o polimorfismo da *ACE* rs4340 mostrou significância ao comparar as frequências dos genótipos (Tabela 15).

No entanto em alguns modelos genéticos houve significância de alguns polimorfismos: *ACE2350* (modelo aditivo e alélico), *ATIR* (modelo dominante, aditivo e alélico) e *ADDI* (modelo recessivo) e também do *ACE I/D* em todos os modelos (Tabela 16).

Após análise multivariada apenas o *ACE I/D* se associa de forma significativa com HTA no sexo masculino (Tabela 17). Até à presente data, o nosso estudo foi o primeiro que teve a iniciativa de investigar, especificamente para os dois géneros, os polimorfismos associados com a HTA, na população Portuguesa. Curiosamente, já existiam publicações de trabalhos anteriores em que também tinha sido encontrada associação significativa do *ACE I/D* com a HTA, apenas no género masculino (<sup>230</sup>, <sup>231</sup>).

### **VI.5.2. Género Feminino**

Ao comparar a frequência dos genótipos apenas o polimorfismo *GNB3* se associou de forma significativa e independente com a HTA, no género feminino (Tabela 18). No entanto, como havíamos verificado para o sexo masculino, houve significância das variantes *ADD1* (modelo recessivo) e *GNB3* (modelos dominante, aditivo e alélico) (Tabela 19).

Após análise multivariada apenas a variante *GNB3* se associa de forma significativa com HTA no sexo feminino (Tabela 20).

### **VI.5.3. Subgrupo da população diabética hipertensa**

Verificou-se o aparecimento de alguns polimorfismos associados com a HTA no grupo dos doentes diabéticos em alguns modelos genéticos: *ATIR* rs186 (modelo dominante, aditivo e alélico), *ADD1* rs4961 (modelo alélico) e *GNB3* rs5443 (modelo dominante) (Tabela 22).

Como é do nosso conhecimento os doentes diabéticos, com resistência à insulina apresentam maior reabsorção de sódio e consequentemente maior risco de HTA e estas variantes genéticas que interferem neste mecanismo, poderão exacerbar o risco de HTA nos diabéticos.

Após análise multivariada com todos os genótipos, apenas o heterozigoto CT da *GNB3* e o heterozigoto AC da *ATIR* mostraram significância independente com HTA. Este aspeto pode ter sido motivado pelo tamanho reduzido da amostra (Tabela 23).

Salienta-se também o fato da obesidade estar muitas vezes associada à diabetes e o papel importante que as proteínas G desempenham na adipogénese dos doentes diabéticos <sup>(232)</sup>.

### **VI.5.4. Subgrupo dos Obesos com hipertensão**

Em alguns estudos da literatura, que consultamos, o alelo T do polimorfismo *GNB3* associou-se com a Obesidade, por ter a capacidade de aumentar a sinalização das proteínas G. Estas por um lado estimulam a adipogénese <sup>(232)</sup> e por outro atenuam a lipólise <sup>(233)</sup>. Nesta população não houve diferenças significativas entre os dois grupos possivelmente devido ao fato de que a obesidade (fator ambiental) por si só apresentava um risco tão elevado que sobrelevava o conferido pelos fatores genéticos.

#### VI.5.5. Estudo genético da população em relação ao consumo de sal

No presente estudo e com a metodologia usada, no grupo com maior consumo de sal não apareceu associação com HTA em nenhuma das 13 variantes genéticas estudadas. Deduzimos que, nos indivíduos com consumo elevado de sódio a genética pouco interfere no aparecimento e progressão para a HTA. Existem nestes, outros mecanismos preferenciais provavelmente ligados ao estilo de vida, que se sobrepõem nesta progressão. Pelo contrário nos indivíduos com baixo consumo de sódio, que eram predominantemente do sexo feminino, surgiram as variantes *ADRB1* (genótipo RR; OR=3,1; p=0,009) e *ADD1* (genótipo TT; OR=2; p=0,009) como associadas, de forma significativa e independente com a HTA.

Como era de esperar, foi o grupo com menor consumo de sódio que mostrou maior associação com a componente genética e onde esta componente representou um maior peso na sua etiopatogenia. Os que desenvolvem HTA, mesmo com menor consumo de sal, apresentam maior sensibilidade ao sal conferida pela sua predisposição genética ligada à existência da variante *ADD1*. Já Cusi et al., em 1997 <sup>(234)</sup> estudaram em hipertensos a resposta da PA às alterações apresentadas pela administração aguda e crónica de sódio, em indivíduos heterozigotos G460W vs. homozigotos G460G. Apesar da ingestão de sódio ser idêntica em ambos os grupos, os heterozigotos apresentavam menor atividade de renina plasmática em relação aos homozigotos. Este autor concluiu que o alelo 460W da *ADD1* estava associado ao aumento da PA, não em todos os hipertensos, mas apenas nos sensíveis ao sal e com baixa de renina plasmática, contribuindo assim, para valorizar a importância do papel da genética no fenótipo da sensibilidade ao sal.

Na nossa população, as variantes que se associaram à HTA nos indivíduos com menor consumo de sal foram a *ADD1* e a *ADRB1* (Tabela 25 e 26).

Após análise multivariada, estas variantes permaneceram na equação (Tabela 27).

Penso também ser, o presente estudo o primeiro a investigar, na população Portuguesa, esta associação significativa.

## VI.6. Estudo genético em relação às lesões de Órgão Alvo nos Hipertensos

### VI.6.1. Insuficiência/lesão renal

O nosso grupo de doentes hipertensos com Insuficiência/lesão renal apresentou uma variante genética, *ATP2B1* rs2681472 com associação significativa e independente com o aparecimento de Insuficiência/lesão renal (Tabelas 29 e 30).

As novas técnicas de genética molecular ofereceram novas ideias sobre a etiopatogenia da Insuficiência Renal, nos doentes hipertensos. Ao compreender melhor os mecanismos fisiopatológicos inerentes ao seu aparecimento, alargamos as possibilidades de diagnóstico precoce e novas terapêuticas inovadoras poderão surgir.

Recentemente, uma grande meta-análise de GWAS efetuada em europeus preformada pelo consórcio CHARGE identificou alguns novos loci associados com a PA sistólica (SBP) e a PA diastólica (DBP). O gene *ATP2B1* está localizado no cromossoma 12q21 e codifica uma proteína pertencente à família das ATPases tipo P responsável pelo transporte primário de iões do tipo P caracterizando-se pela formação de um aspartilfosfato intermediário durante o ciclo de reação. Essas enzimas removem os iões de cálcio bivalentes de células eucarióticas contra grandes gradientes de concentração e desempenham um papel crítico na homeostase de cálcio intracelular, aumentando a hipertensão arterial por vasoconstrição. A variante deste gene que de forma mais significativa se associou com a hipertensão arterial no estudo CHARGE, foi a rs2681472 *ATP2B1*, também alvo do nosso estudo.

Salientamos que no presente estudo e após análise multivariada a variante genética *ATP2B1* rs2681472 se mantém na equação e se associa de forma significativa e independente à IR/lesão renal nos hipertensos. Voltamos a salientar o aspeto interessante de que os indivíduos portadores do genótipo GG do *ATP2B1* têm um poder preditivo de IR/lesão renal em hipertensos, com OR= 4,4 (p=0,022) (Tabela 31).

Poderemos especular que os doentes com esta variante genética, já apresentariam nas fases precoces da sua vida, alterações da reatividade vascular que iriam modular lesões

do nefrónio, que ao evoluir, ao longo do tempo, poderiam originar a lesão/insuficiência renal.

Outro trabalho publicado no *J Am Heart Assoc* em 2014 <sup>(235)</sup>, investigou a expressão genética de várias variantes deste gene e sua associação com a HTA resistente. Este trabalho sugere que as variações genéticas de genes associados à regulação do tónus vascular estão também associadas com enorme risco de HTA resistente. Estas variações genéticas perturbam os mecanismos bioquímicos envolvidos na vasodilatação e podem afetar a resposta da PA aos agentes anti-hipertensivos. O prejuízo adicional na vasodilatação pode explicar a resistência a múltiplos agentes anti hipertensores que se observa na HTA resistente.

Uma melhor compreensão do papel destas variantes genéticas na HTA com lesão/insuficiência renal, poderá proporcionar uma mais precoce identificação dos doentes com grande necessidade de terapêutica farmacológica e mesmo sugerir, a alguns destes doentes, terapêuticas não farmacológicas (ablação de nervo renal ou dispositivos de estimulação de baroreceptores). Assim ao reduzirmos o tempo usado para controlo da PA iremos reduzir a frequência do aparecimento de lesão renal e também de HTA resistente.

Estes marcadores genéticos também poderão ser uteis na redução da mortalidade e morbilidade cardiovascular, nestes doentes hipertensos com lesão renal.

#### **VI.6.2. Retinopatia Hipertensiva**

Nos doentes hipertensos, com retinopatia hipertensiva, foram investigados os 13 polimorfismos do nosso estudo, mas nenhum se associou ao aparecimento de retinopatia hipertensiva. Possivelmente outras variantes, mais específicas, poderão mostrar associação com esta patologia.

### **VI.6.3. Cardiopatia hipertensiva**

Com a metodologia indicada, na obtenção dos dois grupos estudados, verificamos a existência de uma variante que se mostrou significativa, na análise multivariada mesmo após correção para todos os fatores de confusão. Foi a variante *SCNN1G* rs5718, mas que curiosamente se mostrou protetora da evolução para a cardiopatia hipertensiva (Tabelas 33 e 34).

### **VI.6.4. Doença Cerebrovascular**

Não foi possível fazer este estudo, em virtude da pequena dimensão da amostra.

### **VI.6.5. Estudo combinado dos fatores que se associaram ao aparecimento de LOA nos Hipertensos (genéticos e não genéticos)**

#### **VI.6.5.1. Fatores não genéticos**

Estudamos na nossa população os seguintes fatores que interferem na evolução para as lesões de órgão alvo nos hipertensos; Fatores não modificáveis como sejam género e idade e modificáveis: tempo de diagnóstico de HTA e HTA controlada. Estes dois últimos não conferem uma informação precisa em virtude de o tempo de diagnóstico depender do fato do indivíduo ter conhecimento ou não do início da sua HTA, porque muitas vezes o diagnóstico é tardio, feito anos depois do início da doença. O outro fator intitulado HTA controlada, também não é exato, pois o doente pode apresentar uma PA controlada presentemente, mas ter havido descontrolo por períodos desconhecidos.

Apesar desta inexatidão achamos importante a sua inclusão neste estudo.

Após análise multivariada os fatores não genéticos associados ao aparecimento de LOA de forma significativa foram o sexo e o tempo de diagnóstico (Tabela 39).

#### **VI.6.5.2. Fatores genéticos**

Após análise multivariada apenas uma variante genética *ADRB1* mostrou significância estatística com o aparecimento de LOA nos hipertensos (Tabela 40). Esta variante ao interferir no Sistema Nervoso Simpático confere maior vasoconstrição e taquicardia condicionando assim, aumento do “*remodling*” da parede Vascular que contribui para a lesão dos pequenos vasos.

#### **VI.6.5.3. Fatores genéticos e não genéticos**

Como era de esperar foram os 2 polimorfismos, *ADRB1*, *ATP2B1* que mostraram associação significativa com o aparecimento de LOA nos hipertensos (na análise multivariada) (Tabela 41).

Ao pesquisar o poder preditivo para LOA (Curva ROC), com todos os fatores de risco não genético para LOA (sexo, idade, tempo de diagnóstico e HTA controlada) e as variantes genéticas de risco, verificamos que a junção das variantes acrescenta algum risco, mas esta adição não se mostra significativa. O poder preditivo aumenta à custa da especificidade pois a sensibilidade fica reduzida (Figura 15 e tabela 42).

#### **VI.6.5.4. Modelos de interação entre fatores genéticos e não genéticos preditores de LOA**

O melhor modelo foi o que englobou a variante *ADRB1* e *ATP2B1*, assim como a idade e o tempo de diagnóstico (Tabela 43).

Este modelo está de acordo com o nosso entendimento, pois as duas variantes estão associadas ao aparecimento de LOA, na nossa população, a primeira com o aumento da atividade simpática e a segunda desempenhando um papel crítico na homeostase de cálcio intracelular. A idade e o tempo de diagnóstico são para nós intuitivos.

## VI.7. *Score* genético de risco e HTA

A partir de 1955 e após os estudos de Pickering GW (1955) <sup>(236)</sup>, foi concebida a noção de que a HTA essencial era uma doença poligénica sendo, esta hipótese, confirmada posteriormente, por vários grupos de investigadores.

Sabemos que o efeito do peso relativo do risco de cada variante genética, no fenótipo final hipertensivo é pequeno, justificando-se, por isso, o uso de um conjunto de variantes que, no seu todo, conferem maior poder preditivo relativamente ao conferido pelo risco individual de cada uma.

Assim, afigurou-se-nos importante criar um *Score* Genético de Risco (SGR) para cada indivíduo, quantificado pelo conjunto de todos os «riscos» e «proteções» concedido por todas as variantes genéticas estudadas.

Nesta linha de investigação fomos analisar a distribuição do número de alelos de risco pelos casos e controlos, na população investigada e verificamos que a partir do 11º alelo de risco a percentagem de casos era mais elevada do que a de controlos, verificando-se o oposto nos grupos com menos de 10 alelos de risco. Constatou-se também que, quanto maior o número de alelos de risco, maior era o valor preditivo (OR) de HTA (Figura 17).

Atendendo a esta observação, achamos útil a elaboração de um *score* de risco genético (SGR), para avaliar o seu poder preditivo em relação ao aparecimento de HTA.

Decidimos usar, na elaboração deste *score*, todas as 13 variantes genéticas alvo do nosso estudo e que se encontravam dentro do equilíbrio de Hardy-Weinberg. Achamos importante incluir todas, mesmo aquelas que apesar de referidas como associadas à HTA, em estudos da literatura, não atingiam significância estatística, na população em estudo. Isto porque apesar de cada variante genética, isoladamente, não obter significância estatística relativamente ao risco de HTA, poder adicionar um pequeno efeito no risco total. Todas as variantes genéticas selecionadas pertenciam a eixos fisiopatológicos concordantes com doença hipertensiva.

Optamos pela construção de dois modelos de *score* genético (aditivo e multiplicativo).



Confirmamos que tanto no *score* de risco aditivo como no multiplicativo, ao dividir o seu valor em quartis, se observava que no 1º quartil existiam mais controlos do que casos, acontecendo o oposto no quarto quartil. Comparando o 4º quartil com o 1º quartil, constatou-se que os indivíduos do 4º quartil do *score* apresentavam maior risco de HTA em relação aos do 1º e com significância estatística (Tabelas 44 à 47).

Também, nos dois modelos de *score* testados, ao comparar as medianas evidenciamos que os casos apresentavam uma mediana mais elevada do que os controlos (Figura 20 e 21).

Assim, concluímos que os dois modelos de *score* genético, aditivo e multiplicativo, conferiam poder preditivo de HTA. No entanto era importante avaliar qual dos dois seria o melhor modelo na predição de HTA. Com este fim efetuámos uma análise de regressão logística para os dois *scores*. O melhor poder de associação foi demonstrado pelo *score* multiplicativo com OR 1,59 (Tabela 48).

Fomos depois avaliar através de duas curvas ROC qual dos modelos de *score* apresentava melhor capacidade preditiva. Globalmente foi o *score* de risco multiplicativo que apresentou melhor sensibilidade e melhor poder preditivo (AUC 0,57) para a ocorrência de HTA (Figura 22 e tabela 49).

Depois de testar qual o melhor modelo de *score* genético a utilizar e com o objetivo do seu uso na prática clínica diária, pareceu-nos importante avaliar qual o incremento que ele representa na previsão de risco de HTA, em relação aos FRT.

#### **VI.7.1. Valor preditivo adicional do *score* genético em relação aos fatores de risco tradicionais de HTA**

Foi realizada uma análise multivariada com todos os fatores de risco tradicionais e mais o *score* multiplicativo. Este permaneceu na equação mostrando que se associava, de forma significativa e independente com a suscetibilidade para a HTA. Também a diabetes, a obesidade, o abuso de álcool e a história familiar de HTA, permaneceram na equação, sendo que, foi a diabetes e a obesidade que apresentaram maior poder de

associação com a HTA (Tabela 50).

Finalmente as curvas ROC efetuadas, quando comparadas, com a finalidade de avaliar qual o incremento adicional da junção do SGRm aos FRT, apresentaram um ligeiro incremento adicional da AUC mas com significância estatística, aumentando ligeiramente o poder preditivo do modelo (Figura 23 e tabela 51).

Em relação aos dois géneros verificou-se o mesmo aspeto (Figuras 25 e 26 e tabelas 54 e 56).

A abordagem que foi efetuada em relação ao SRG confirma a validade do mesmo, indicando que a junção das variantes está associada de forma independente e significativa à incidência de HTA. No entanto a análise de discriminação mostrou que a informação adicionada pelo SRG em relação aos fatores de risco não-genéticos é marginal. De fato, o poder da associação do SRG com a incidência de HTA é substancialmente menor quando comparado com o status de obesidade (OR=3;  $p<0,0001$ ), de diabetes (OR=4,2;  $p<0,0001$ ) ou história familiar de hipertensão positiva (OR=2,8;  $p<0,0001$ ) (Tabela 50). Se o poder de associação que foi testado no nosso estudo é relativamente baixo, também a melhoria nos índices AUC é muito modesta para adicionar valor preditivo clinicamente significativo, quando é adicionado aos fatores de risco tradicionais (Figura 23). Os nossos resultados estão em linha com estudos recentes que também investigaram o SRG e que mostraram uma melhora geral modesta nas estimativas de risco e valor preditivo (<sup>237</sup>, <sup>238</sup>).

O motivo deste pequeno incremento não está claro, mas provavelmente reflete o fato de que apenas um subconjunto dos SNPs, incluídos no SRG, estava significativamente associado às características da nossa população. Assim, as variantes não significativas provavelmente contribuíram para a diluição da amplitude dos resultados. Na verdade, é possível que outros SNPs provenientes de GWAS mais recentes, ou uma abordagem com outros genes candidatos mais significativos para a nossa população, possam ser implementados num futuro SRG melhor adaptado, podendo melhorar a sua previsibilidade. A evidência acumulada, até à data, mostra que variantes genéticas mais raras, em genes responsáveis pelas formas mendelianas de hiper e hipotensão,

representam grandes diferenças na PA nos portadores dessas variantes, em relação a indivíduos de tipo selvagem sem a mutação (<sup>239</sup>, <sup>240</sup>).

Assim, adicionar essas variantes raras em um SRG poderia aumentar substancialmente o valor preditivo do mesmo. O objetivo principal da genética de doenças complexas continua sendo a identificação de novos genes que possam ajudar a melhorar a nossa compreensão das vias metabólicas associadas, como possíveis novos alvos farmacológicos úteis na terapêutica. No entanto, a questão da predição é sempre relevante e intrigante.



## **CAPÍTULO VI**

### **CONCLUSÕES**



## VII. CONCLUSÕES

Em primeiro lugar iremos sistematizar e ordenar as principais conclusões que inferimos do nosso trabalho de investigação

- 1- Em relação às características basais da população, o grupo dos hipertensos apresentava mais sedentarismo, maior abuso de álcool e valores antropométricos mais elevados. Em relação ao tabagismo verifica-se o oposto existindo menor percentagem de indivíduos hipertensos com hábitos tabágicos.

Os valores da PAS e da PAD são mais elevados no grupo dos hipertensos.

Os valores médios da VOP, assim como a percentagem de indivíduos com VOP elevada ( $>10\text{m/s}^2$ ) são também mais elevados no grupo dos hipertensos. Também neste grupo existe maior incidência de doença cerebrovascular (AVC/AIT) e história prévia de DAC/EAM, assim como maior percentagem de história familiar de HTA e DCV. A diabetes, obesidade e dislipidemia foram mais representativas no grupo dos hipertensos.

- 2- Em relação às características bioquímicas os valores séricos do colesterol-HDL e LDL estavam mais elevados nos não hipertensos sendo que o colesterol total e os triglicéridos estavam mais elevados no grupo dos hipertensos.

Os valores séricos da glicose, fibrinogénio, PCR (as) e creatinina plasmática encontravam-se mais elevados no mesmo grupo.

- 3- Das variantes genéticas investigadas as que, na nossa população e no melhor modelo genético se associaram de forma significativa com a Hipertensão Arterial, foram a *ACE* rs4340, *ACE* 2350 rs4343, *ADRB1* rs1801253, *ADD1* rs4961 e *GNB3* rs5443.

O seu poder de associação com a HTA é semelhante ao da literatura internacional com exceção da variante *ADD1* rs4961 que apresenta um poder de associação muito superior ao encontrado na literatura internacional.

As variantes genéticas significativas pertenciam aos seguintes eixos fisiopatológicos: Eixo da SRAA, Sistema Nervoso Simpático, Sistema do Balanço do Sódio e Eixo Celular.

- 4- A capacidade preditiva de HTA aumentava à medida que se associam mais variantes genéticas estabilizando a partir da junção da 6ª variante.

Verificou-se que havia um bom valor preditivo de HTA, quando se associavam os cinco SNPs significativos e um valor ligeiramente superior quando, nesta associação eram usados os fatores de risco tradicionais significativos (com significância estatística).

- 5- Quando investigamos a interação entre os genes do estudo, no risco de HTA, verificamos que não existia nenhum modelo preferencial.

Ao investigar o melhor modelo de interação gene/ambiente, no risco de HTA, averiguamos que este era constituído pela junção da variante *ADD1*, pela existência de obesidade e de diabetes na população.

- 6- Através dos modelos genéticos estudados, os polimorfismos *ACE I/D*, *ACE2350*, *AT1R* e *ADD1* apresentaram-se significativos no género masculino e o *ADD1* e *GNB3* no género feminino.

- 7- As variantes genéticas que de forma significativa se associaram ao risco de HTA, nos doentes diabéticos, foram por ordem decrescente da sua significância a variante *AT1R*, *GNB3* e a variante *ADD1*.

- 8- Não houve, na população com obesidade, variantes genéticas com associação significativa ao risco de HTA.

- 9- Na população com maior consumo de sal, não se registou nenhuma associação entre as variantes genéticas estudadas e o aparecimento de HTA.

Na população com menor consumo de sal, as variantes genéticas *ADRB1* e *ADD1* associaram-se de forma significativa com a HTA.

- 10- No grupo de doentes hipertensos com lesão/Insuficiência Renal o polimorfismo *ATP2B1* associou-se, de forma significativa, com a existência de



Insuficiência/lesão renal.

- 11- Não houve nenhuma associação genética no grupo dos doentes hipertensos com retinopatia hipertensiva.
- 12- No grupo dos doentes hipertensos com cardiopatia Hipertensiva houve uma variante (*SCNN1G*) que se mostrou protetora de forma significativa.
- 13- Os fatores não genéticos que se associaram com o aparecimento de Lesão de Órgãos Alvo, nos hipertensos, foram o sexo e o tempo de diagnóstico.
- 14- As variantes genéticas que se associaram na análise univariada com o aparecimento de Lesão de Órgãos Alvo, nos hipertensos, foram o *ADRB1*, *ATP2B1* e *SCNN1G* (de forma protetora).
- 15- No estudo combinado entre fatores genéticos e não genéticos preditores de Lesão de Órgãos Alvo, nos hipertensos, as variáveis sexo, tempo de diagnóstico e as duas variantes *ADRB1* e *ATP2B1* associaram-se de forma significativa e independente com o aparecimento de lesão de Órgãos Alvo.
- 16- O valor preditivo dos fatores não genéticos associados, de forma significativa, com a Lesão de Órgãos Alvo foi pequeno e o incremento adicional, verificado com a junção das duas variantes genéticas significativas, não atingiu significância estatística, melhorando apenas a especificidade do modelo.
- 17- O melhor modelo de interação entre fatores genéticos e não genéticos preditivos de Lesão de Órgãos Alvo foi o constituído pela idade, tempo de diagnóstico e pelos genes *ADRB1* e *ATP2B1*.
- 18- Constatou-se que, na distribuição do número de alelos de risco, a partir do 11º alelo de risco a percentagem de casos era mais elevada do que a de controlos, verificando-se o oposto nos grupos com menos de 10 alelos de risco. Verificou-se também que, quanto maior o número de alelos de risco, maior era o valor preditivo (OR) de HTA.
- 19- Dos dois scores elaborados, o multiplicativo mostrou melhor poder preditivo de HTA.

- 20- Quando aos Fatores de Risco Tradicionais se adicionava o Score Genético multiplicativo, o incremento adicional do risco de aparecimento de HTA foi significativo, mas de pequena dimensão
- 21- No género masculino este acréscimo foi mais significativo e a sua significância manteve-se no género feminino, embora com um valor ligeiramente inferior.

**CAPÍTULO VII**  
**CONSIDERAÇÕES FINAIS SOBRE OS**  
**ACHADOS DESTA INVESTIGAÇÃO**



## VIII. CONSIDERAÇÕES FINAIS SOBRE OS ACHADOS DESTA INVESTIGAÇÃO

Embora os fatores demográficos, clínicos e ambientais desempenhem um papel importante no aumento do risco do aparecimento de HTA, não está claramente esclarecida a razão pela qual alguns indivíduos que apresentam fatores de risco semelhantes, têm elevado risco de HTA e outros não.

O objetivo desta investigação foi ajudar na compreensão de alguns fatores genéticos subjacentes, sua investigação, isolados ou agrupados, suas implicações e contribuição para o estudo da suscetibilidade hipertensiva da População do Arquipélago da Madeira.

Investigamos também, sob o aspeto genético, subgrupos de populações diabéticas, obesas, populações com consumo elevado e baixo de sódio. O estudo genético e não genético dos fatores preditivos das Lesões de Órgão Alvo foi também objeto deste trabalho.

Um dos achados que considero importante, neste trabalho, foi o respeitante á presença, significativa, da variante *ATP2B1* no subgrupo dos doentes hipertensos com lesão/insuficiência renal. Esta variante, tão prevalente, nestes doentes, poderá representar um futuro marcador de progressão para lesão/insuficiência renal e permitir, com o seu uso, identificar doentes com necessidade de terapêutica farmacológica ou não farmacológica o que possibilitaria reduzir o tempo de controlo da HTA e assim reduzir a progressão para a lesão/ insuficiência renal.

O SRG foi uma das maneiras mais promissoras para agregar múltiplos resultados em um único preditor genético para HTA. É necessário mais trabalho para identificar outros fatores genéticos associados aos fenótipos subclínicos evolutivos para doença hipertensiva e englobá-los nos scores de risco genético que, desta forma, poderão conglomerar variantes genéticas relevantes. Conseguimos, com o presente trabalho, um SRG com capacidade preditiva adicional significativa, mas de pequena magnitude em relação aos FRT. No entanto, as questões permanecem sobre a sua utilidade clínica final.

Investigação adicional deverá prosseguir no futuro incluindo novas variantes genéticas mais significativas, nomeadamente as variantes raras. Consideramos como provável que a sua adição aos fatores de risco tradicionais, se venha a revelar prometedora no futuro.



## **BIBLIOGRAFIA**





## BIBLIOGRAFIA

- 
- <sup>1</sup> Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL Jr, et al. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *JAMA* 2003; 289:2560-72.
- <sup>2</sup> World Health Organization. Causes of Death 2008 [online database]. Geneva: World Health Organization; [serie na internet] 2008 citado 24 Out 2013.
- <sup>3</sup> Cowley AW. The genetic dissection of essential hypertension. *Nature Reviews Genetics*. 2006; 7: 829-40.
- <sup>4</sup> Ward R. Familial aggregation and genetic epidemiology of blood pressure. In: Hypertension: pathophysiology, diagnosis and management. Laragh JH, Brenner BM (editors). *New York Raven Press* 1990;81-100.
- <sup>5</sup> Kingwell B, Boutouyrie P. Genetic influences on the arterial wall. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2007; 34: 652-7.
- <sup>6</sup> World Health Organization. A global brief on Hypertension. Silent killer, global public health crisis. *World Health Day* 2013.
- <sup>7</sup> Binder A. A review of the genetics of essential hypertension. *Current Opinion in Cardiology*. 2007; 22: 176-84.
- <sup>8</sup> 2013 European Society of Hypertension-European Society of Cardiology Guidelines for the management of arterial hypertension. *European Heart Journal*. 2013; 34, 2159-219.
- <sup>9</sup> World Health Organization. TEN YEARS IN PUBLIC HEALTH 2007-2017. Geneva: WHO; 2017.
- <sup>10</sup> Kearney PM, Whelton M, Reynolds K, Muntner P, Whelton PK, He J. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet*. 2005; 365(9455): 217-23.
- <sup>11</sup> Hebert PR, Moser M, Mayer J, Glynn RJ, Hennekens CH. Recent evidence on drug therapy of mild to moderate hypertension and decreased risk of coronary heart disease. *Arch Internal Med*. 1993; 153:578-81.
- <sup>12</sup> Worsley A. Diet and hypertension in the Asia-Pacific region: a brief review. *Asia Pac J Clin Nutr*. 2001; 10(2): 97-102.
- <sup>13</sup> Polonia J, Martins L, Pinto F, Nazare J. Prevalence, awareness, treatment and control of hypertension and salt intake in Portugal: changes over a decade. The PHYSA study. *J Hypertens*. 2014;32:1211-21.

- 
- <sup>14</sup> Macedo ME, Lima MJ, Silva AO, Alcântara P, Ramalhinho V, Carmona J. Prevalence, awareness, treatment and control of hypertension in Portugal: the PAP study. *J Hypertens*. 2005; 23:1661-6.
- <sup>15</sup> Freis ED: Hemodynamics of hypertension. *Physiol Rev*. 1960; 40:27-54.
- <sup>16</sup> Frohlich ED. The first Irvine H. Page lecture: The mosaic of hypertension: past, present and future. *J Hypertens*. 1988; 6(4):S2-11.
- <sup>17</sup> Frohlich ED, Apstein C, Chobanian AV, Devereux RB, Dustan HP, Dzau V, et al. The heart in hypertension. *N Engl J Med*. 1992; 327:998-1008.
- <sup>18</sup> Izzo JL Jr, Smith RJ, Larrabe PS, Kallay MC. Plasma norepinephrine and age as determinants of systemic hemodynamics in men with established essential hypertension. *Hypertension*. 1987; 9:415-19.
- <sup>19</sup> Weir MR, Dzau VJ. The renin-angiotensin-aldosterone system: a specific target for hypertension management. *American Journal of Hypertension*. 1999; vol.12,no.12, Pt 3. 205s–13s.
- <sup>20</sup> Crisan D, Carr J. Angiotensin I-converting enzyme: genotype and disease associations. *J Mol Diagn*. 2000;2:105-15.
- <sup>21</sup> Carluccio M, Soccio M, De Caterina R. Aspects of gene polymorphisms in cardiovascular disease: the renin-angiotensin system. *Eur J Clin Invest*. 2001; 31(6): 476-88.
- <sup>22</sup> Campbell DJ. Critical review of prorenin and (pro)renin receptor research. *Hypertension*. 2008; 51:1259-64.
- <sup>23</sup> Norman M. Kaplan, Lippincott Williams & Wilkins. Kaplan's Clinical Hypertension, 9th edn, Philadelphia
- <sup>24</sup> Klabunde RE. 2007. Renin-Angiotensin-Aldosterone System. Date Accessed: January 2009 Website. Available from: <http://www.cvphysiology.com/Blood%20Pressure/BP015.htm>.
- <sup>25</sup> Marcheselli S, Micieli G. Renin-angiotensin system and stroke. *Neurological Science* 2008; 29: S277-S278
- <sup>26</sup> Carey RM, Siragy HM. Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocr Rev*. 2003;24:261-71.
- <sup>27</sup> Kobori H, Nangaku M, Navar LG, Nishiyama A. The Intrarenal Renin-Angiotensin System: From Physiology to the Pathobiology of Hypertension and Kidney Disease. *Pharmacological Reviews* 2007; 59(3): 251-87.
- <sup>28</sup> Beevers G, Lip GYH, O'Brien E. The pathophysiology of hypertension. *BMJ: British Medical Journal*. 2001; 322(7291):912-16.

- 
- <sup>29</sup> Carey RM, Wang Zhi-Qin, Siragy MH. Role of the angiotensin type 2 receptor in the regulation of blood pressure and renal function. *Hypertension* 2000; 35: 155-63.
- <sup>30</sup> Tipnis SR, Hooper NH, Hyde R, Karran E, Christie G, Turner AJ. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000; 275: 33238-43.
- <sup>31</sup> Crackower MA, Sarao R, Oudit GY, Yagil C, Kozieradzki I, Scanga SE et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature* 2002; 417: 822-8.
- <sup>32</sup> Wakahara S, Konoshita T, Mizuno S, Motomura M, Aoyama C, Makino Y, et al. Synergistic expression of angiotensin-converting enzyme (ACE) and ACE2 in human renal tissue and confounding effects of hypertension on the ACE to ACE2 ratio. *Endocrinology*. 2007;148:2453-7.
- <sup>33</sup> Torres EM, Oyarzún A, Mondaca-Ruff D, Azocar A, Castro PF, Jalil JE et al. ACE2 and vasoactive peptides: novel players in cardiovascular/renal remodeling and hypertension. *Ther Adv Cardiovasc Dis* 2015, Vol. 9(4) 217-37.
- <sup>34</sup> Snyder PM. Minireview: regulation of epithelial Na<sup>+</sup> channel trafficking. *Endocrinology*. 2005; 146(12):5079-85.
- <sup>35</sup> Carey RM. Aldosterone and cardiovascular disease. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2010;17(3):194-8.
- <sup>36</sup> Rahimmanesh I, Shahrezaei M, Rashidi B. High blood pressure and endothelial dysfunction: effects of high blood pressure medications on endothelial dysfunction and new treatments. *Journal of Research in Medical Sciences*. 2012; S 298-311.
- <sup>37</sup> Kanagy NL. Alpha(2)-adrenergic receptor signalling in hypertension. *Clinical Science* 2005; 109(5): 431-7.
- <sup>38</sup> Johnson RJ, Feig DI, Nakagawa T, Sanchez-Lozada G, Rodriguez-Iturbe B. Pathogenesis of essential hypertension: historical paradigms and modern insights. *J Hypertens*. 2008; 26(3): 381– 91.
- <sup>39</sup> Sanjuliani A F. Fisiopatologia da hipertensão arterial: conceitos teóricos úteis para a prática clínica. *Revista Brasileira de Cardiologia*. 2002; 210-18.
- <sup>40</sup> Irigoyen MC, Fiorino P, De Angelis K, Krieger E M. Sistema nervoso Simpático e Hipertensão arterial: reflexos cardiocirculatórios. *Ver Bras Hipertens* 2005 vol 12 (4) 229-33.
- <sup>41</sup> Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of the arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288:373-6.
- <sup>42</sup> Ferro CJ, Webb DJ. Endothelium dysfunction and hypertension. *Drugs*. 1997; 53 Suppl 1):30-41.

- 
- <sup>43</sup> Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*. 1988; 332:411- 5.
- <sup>44</sup> Sciffrin EI. Endothelin: potential role in hypertension and vascular hypertrophy. *Hypertension*. 1995; 25:1135-43.
- <sup>45</sup> Neutel JM. Effect of the renin-angiotensin system on the vessel wall: using ACE inhibition to improve endothelial function. *Journal of Human Hypertension* 2004; 18(9): 599-606.
- <sup>46</sup> Joffy S, Rosner MH. Natriuretic peptides in ESRD. *American Journal of Kidney Diseases: The official Journal of the National Kidney Foundation* 2005; 46(1): 1-10.
- <sup>47</sup> Woodard GE, Rosado JA. Natriuretic peptides in vascular physiology and pathology. *International Review of Cell and Molecular Biology* 2008; 268: 59-93.
- <sup>48</sup> Zeng C, Sanada H, Watanabe H, Eisner GM, Felder RA, Jose PA. Functional genomics of the dopaminergic system in hypertension. *Physiol Genomics*. 2004 Nov 17; 19(3):233-46. Review.
- <sup>49</sup> Staessen JA, Kuznetsova T, Zhang H, Maillard M, Bochud M, Hasenkamp S, Westerkamp J, Richart T, Thijs L, Li X, Brand-Herrmann SM, Burnier M, Brand E. Blood pressure and renal sodium handling in relation to genetic variation in the DRD1 promoter and GRK4. *Hypertension*. 2008 Jun; 51(6):1643-50.
- <sup>50</sup> Siffert W. G protein polymorphisms in hypertension, atherosclerosis, and diabetes. *Annu Rev Med*. 2005; 56:17-28. Review
- <sup>51</sup> 2003 European Society of Hypertension-European Society of Cardiology Guidelines for the management of arterial hypertension. *Journal of Hypertension* 2003; 21:1011-1053
- <sup>52</sup> Pimenta E. Hypertension in women. *Hypertens Res* 2012;35(2):148-52
- <sup>53</sup> Carretero OA, Oparil S. Essential Hypertension: Part I: Definition and Etiology. *Circulation* 2000; 101: 329-335.
- <sup>54</sup> Kurtz TW, Al-Bander HA, Morris RC Jr. "Salt-sensitive" essential hypertension in men. Is the sodium ion alone important? *N Engl J Med*. 1987;317(17):1043-8.
- <sup>55</sup> Strazzullo P, D'Elia L, Kandala NB, Cappuccio FP. Salt intake, stroke, and cardiovascular disease: meta-analysis of prospective studies. *BMJ* 2009; 339:b4567.
- <sup>56</sup> Intersalt Cooperative Research Group. An international study of electrolyte excretion and blood pressure: results for 24 hour urinary sodium and potassium excretion. *BMJ* 1988; 297:319-28.
- <sup>57</sup> Després JP, Lamarche B, Mauriège P, Cantin B, et al. Hyperinsulinemia as an independent risk factor for ischemic heart disease. *N Engl J Med* 1996; 334: 952-7.

- 
- <sup>58</sup> Laakso M, Edelman SV, Brechtel G, Baron AD. Effects of epinephrine on insulin-mediated glucose uptake in whole body and leg muscle in humans: role of blood flow. *Am J Physiol* 1992; 263: E199-204.
- <sup>59</sup> Baron AD, Brechtel-Hook G, Johnson A, Hardin D. Skeletal muscle blood flow. A possible link between insulin resistance and blood pressure. *Hypertension* 1993; 21: 129-35.
- <sup>60</sup> Gans RO, VD Toorn L, Bilo HJ, Nauta JJ, Heine RJ, et al. Renal and cardiovascular effects of exogenous insulin in healthy volunteers. *Clin Sci (Lond)* 1991; 80: 219-25.
- <sup>61</sup> Hall JE, Coleman TG, Mizelle HL, Smith MJ Jr. Chronic hyperinsulinemia and blood pressure regulation. *Am J Physiol* 1990; 258: F722-F731.
- <sup>62</sup> Stout RW, Bierman EL, Ross R. Effect of insulin on the proliferation of cultured primate arterial smooth muscle cells. *Circ Res* 1975; 36: 319-27.
- <sup>63</sup> Reisin E, Abel R, Modan M, Silverberg DS, Eliahou HE, Modan B. Effect of weight loss without salt restriction on the reduction of blood pressure in overweight hypertensive patients. *N Engl J Med* 1978; 298: 1-6.
- <sup>64</sup> Frohlich ED, Messerli FH, Reisin E, Dunn FG. The problem of obesity and hypertension. *Hypertension* 1983; 5: (III): 71-8.
- <sup>65</sup> Alves Silva A. Obesidade e hipertensão arterial: aspectos fisiopatológicos. *Rev. Bras Hipertens.* 2005; vol 12(4): 265-268.
- <sup>66</sup> Haynes WG, Morgan DA, Walsh SA, Sivitz WI, Mark AL. Cardiovascular consequences of obesity: role of leptin. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1998; 25: 65-9.
- <sup>67</sup> Hirose H, Saito I, Tsujioka M, Mori M, Kawabe H, et al. The obese gene product, leptin: possible role in obesity related hypertension in adolescents. *J Hypertens* 1998; 16: 2007-12.
- <sup>68</sup> Julius S. Effect of sympathetic overactivity on cardiovascular prognosis in hypertension. *Eur Heart J* 1998; 19 (suppl F): F14-8.
- <sup>69</sup> Krieger DR, Landsberg L. Obesity and hypertension. In: Laragh JH, Brenner BM, eds. *Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and Management*, 2nd ed. New York, NY: Raven Press Ltd; 1995; 2367-88.
- <sup>70</sup> Carretero OA, Oparil S. Essential hypertension: part II: treatment. *Circulation* 2000; 101(4): 446-53.
- <sup>71</sup> Esler M, Rumantir M, Kaye D, Lambert G. The Sympathetic Neurobiology of Essential Hypertension: Disparate Influences of Obesity, Stress, and Noradrenaline Transporter Dysfunction? *American Journal of Hypertension* 2001; 14: 1395-465.
- <sup>72</sup> Kulkarni S, O'Farrell I, Erasi M, Kochar MS. Stress and hypertension. *WMJ* 1998; 97(11): 34-8.

- 
- <sup>73</sup> Vrijkotte TGM, Doornen LJP, Geus EJC. Effects on work stress on ambulatory blood pressure, heart rate, and heart rate variability. *Hypertension*. 2000;35:880-6.
- <sup>74</sup> Lucini D, Riva S, Pizzinelli P, Pagani M. Stress Management at the Worksite Reversal of Symptoms Profile and Cardiovascular Dysregulation. *Hypertension*. 2007;49:291-297
- <sup>75</sup> Benowitz NL. Cigarette smoking and nicotine addiction. *Med Clin North Am*. 1992; 76:415-37.
- <sup>76</sup> Domino EF. Tobacco smoking and nicotine neuropsychopharmacology: some future research directions. *Neuropsychopharmacology*. 1998; 18:456-68.
- <sup>77</sup> MacMahon S. Alcohol consumption and hypertension. *Hypertension*. 1987; 9:111-21
- <sup>78</sup> Marmot MG, Elliott P, Shipley MJ, et al. Alcohol and blood pressure: The INTERSALT study. *BMJ*. 1994; 308:1263-7
- <sup>79</sup> Ueshima H, Ogihara T, Baba S, et al. The effect of reduced alcohol consumption on blood pressure: A randomized, controlled, single blind study. *J Hum Hypertens*. 1987; 1:113-9.
- <sup>80</sup> Shaper AG, Wannamethee G, Whincup P. Alcohol and blood pressure in middle-aged British men. *J Hum Hypertens*. 1988 Aug;2(2):71-8.
- <sup>81</sup> Sesso HD, Cook NR, Buring JE, et al. Alcohol consumption and the risk of hypertension in women and men. *Hypertension* 2008; 51:1080-7
- <sup>82</sup> Beilin LJ. Alcohol, hypertension and cardiovascular disease. *J Hypertens*. 1995; 13:939-42.
- <sup>83</sup> Cocoa A, Aguilera MT, Sierra AD, et al. Chronic alcohol intake induces reversible disturbances on cellular Na<sup>+</sup> metabolism in humans: Its relationship with changes in blood pressure. *Alcohol Clin Exp Res*. 1992; 16:714-20.
- <sup>84</sup> Husain K, Ansari RA, Ferder L. Alcohol-induced hypertension: Mechanism and prevention. *World Journal of Cardiology*. 2014;6(5):245-252.
- <sup>85</sup> Rafiq S, Anand S, Roberts R. Genome-wide association studies of hypertension: have they been fruitful? *J Cardiovasc Transl Res*. 2010 Jun; 3(3):189-96.
- <sup>86</sup> Quiroga de Michelena MI. Hipertensión arterial-Aspectos genéticos. *An Fac Med*. 2010; 71(4): 231-5.
- <sup>87</sup> Jackson RV, Lafferty A, Torpy DJ, Stratakis C. New genetic insights in familial hyperaldosteronism. *Ann N Y Acad Sci*. 2002 Sep;970:77-88.
- <sup>88</sup> Lee WK, Padmanabhan S, Dominiczak AF. Genetics of hypertension: from experimental models to clinical applications. *J Hum Hypertens*. 2000; 14:631-47.

- 
- <sup>89</sup> Lafferty AR , Torpy DJ , Stowasser H , Taymans SE , Lin JP , Huggard P et al. A novel genetic locus for low renin hypertension: familial hyperaldosteronism type II maps to chromosome 7 (7p22). *J Med Genet.* 2000; 37(11):831-5.
- <sup>90</sup> Hansson JH, Nelson-Williams C, Suzuki H, et al. Hypertension caused by a truncated epithelial sodium channel gamma subunit: genetic heterogeneity of Liddle syndrome. *Nat Genet* (1995); 11: 76–82.
- <sup>91</sup> Shimkets RA, Warnock DG, Bositis CM, Nelson-Williams C, et al. Liddle's syndrome: heritable human hypertension caused by mutations in the beta subunit of the epithelial sodium channel. *Cell* (1994), 79(3):407-14
- <sup>92</sup> Palermo M, Quinkler M, Stewart PM. Apparent mineralocorticoid excess syndrome: an overview. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2004 Oct;48(5):687-96.
- <sup>93</sup> Fan YS, Eddy RL, Byers MG, Haley LL, Henry WM, Nowak NJ, Shows TB. The human mineralocorticoid receptor gene (MLR) is located on chromosome 4 at q31.2. *Cytogenet Cell Genet.* 1989;52(1-2):83-4.
- <sup>94</sup> Friedrich C Luft, MD. Mendelian Forms of Human Hypertension and Mechanisms of Disease. *Clin Med Res.* 2003 Oct; 1(4): 291–300.
- <sup>95</sup> Van Leeuwen N, Caprio M, Blaya C, Fumeron F, Sartorato P, et al. The functional c.2G>C variant of the mineralocorticoid receptor modulates blood pressure, renin, and aldosterone levels. *Hypertension.* 2010 Sep 20.
- <sup>96</sup> Huang C-L, Kuo E, Toto RD. WNK kinases and essential hypertension. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 2008; 17: 133-137.
- <sup>97</sup> Cope G, Golbang A, O'Shaughnessy KM. WNK kinases and the control of blood pressure. *Pharmacol Ther.* 2005 May;106(2):221-31. *Epub* 2005 Jan 26.
- <sup>98</sup> Bähring S, Kann M, Neuenfeld Y, Gong M, Chitayat D, et al. Inversion region for hypertension and brachydactyly on chromosome 12p features multiple splicing and noncoding RNA. *Hypertension* 2008; 51(2): 426-31.
- <sup>99</sup> Maass PG, Aydin A, Luft FC, Schachterle C, Weise A, Stricker S, Lindschau C, et al. PDE3A mutations cause autosomal dominant hypertension with brachydactyly. *Nature Genet.* 2015; 47: 647- 53.
- <sup>100</sup> International HapMap Consortium, Frazer KA, Ballinger DG, Cox DR, Hin. ds DA, Stuve LL, Gibbs RA, et al. A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature.* 2007 Oct 18;449(7164):851-61.
- <sup>101</sup> Regateiro FJ. Manual de Genética Médica.2003, Imprensa da Universidade de Coimbra.
- <sup>102</sup> Ruppert V, Maisch B. Genetics of human hypertension. *Herz* 2003; 28:655-62.

- 
- <sup>103</sup> Ramírez-Bello J, Pérez-Méndez O, Ramírez-Fuentes S, Carrillo-Sánchez S, Vargas-Alarcón G, Fragoso JM. Genética y genómica de la hipertensión arterial: una actualización. *Archivos de Cardiología de México* 2011;81(3):240-250
- <sup>104</sup> Ehret GB. Genome-wide association studies: contribution of genomics to understanding blood pressure and essential hypertension. *Curr Hypertens Rep.* 2010 Feb; 12(1):17-25. Review
- <sup>105</sup> Citterio L, Lanzani C, Manunta P, Bianchi G. Genetics of primary hypertension: the clinical impact of adducin polymorphisms. *Biochim Biophys Acta.* 2010 Apr 8.
- <sup>106</sup> Burton PR, Clayton DG, Cardon LR, Craddock N, Deloukas P, Duncanson A et al. Wellcome Trust Case Control Consortium. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 2007; 447(7145): 661-78.
- <sup>107</sup> Newton-Cheh C, Johnson T, Gateva V, et al. Eight blood pressure loci identified by genome-wide association study of 34,433 people of European ancestry. *Nat Genet* 2009; 41(6): 666–76.
- <sup>108</sup> Levy D, Ehret GB, Rice K, et al. Genome-wide association study of blood pressure and hypertension. *Nat Genet.* 2009; 41:677–87.
- <sup>109</sup> Adeyemo A, Gerry N, Chen G, Herbert A, et al. A genome-wide association study of hypertension and blood pressure in African Americans. *PLoS Genet* 2009 Jul; 5(7): e1000564.
- <sup>110</sup> International Consortium for Blood Pressure Genome-Wide Association Studies, Ehret GB, Munroe PB, et al. Genetic variants in novel pathways influence blood pressure and cardiovascular disease risk. *Nature.* 2011; 478(7367), 103-9
- <sup>111</sup> Tragante V, Barnes MR, Ganesh SK, Lanktree MB, Guo W, Franceschini N, et al. Gene-centric meta-analysis in 87,736 individuals of European ancestry identifies multiple blood-pressure-related loci. *American Journal of Human Genetics.* 2014; Mar 6, 349-60.
- <sup>112</sup> Warren HR, Evangelou E, Cabrera CP, Gao H, Ren M, Mifsud B. Genome-wide association analysis identifies novel blood pressure loci and offers biological insights into cardiovascular risk. *Nat Genet.* 2017 Mar;49(3):403-415.
- <sup>113</sup> Rigat B, Hubert C, Corvol P, Soubrier F. PCR detection of the insertion/deletion polymorphism in the human angiotensin converting enzyme gene. *Nucleic Acids Res.* 1992; 20(6):1433.
- <sup>114</sup> Cambien F, Costerousse O, Tiret L, Poirier O, Lecerf L, Gonzales MF, Evans A, et al. Plasma level and gene polymorphism of angiotensin-converting enzyme in relation to myocardial infarction. *Circulation* 1994;90(2):669-676.



- 
- <sup>115</sup> Danser AH, Schalekamp MA, Bax WA, van den Brink AM, Saxena PR, Riegger GA, Schunkert H. Angiotensin-converting enzyme in the human heart. Effect of the deletion/ insertion polymorphism. *Circulation* 1995; 92: 1387-1388.
- <sup>116</sup> Higashimori K, Zhao Y, Higaki J, Kamitani A, Katsuya T, Nakura J, Miki T, Mikami H, Ogiwara T. Association analysis of a polymorphism of the angiotensin converting enzyme gene with essential hypertension in the Japanese population. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 191 (2): 399–404.
- <sup>117</sup> Duru K, Farrow S, Wang JM, Lockette W, Kurtz T. Frequency of a deletion polymorphism in the gene for angiotensin converting enzyme is increased in African-Americans with hypertension. *Am J Hypertens* 1994; 7 (8): 759–762.
- <sup>118</sup> Ji L.D, Zhang LN, Shen P, Wang P, Zhang YM, Xing WH, Xu J. Association of angiotensinogen gene M235T and angiotensin-converting enzyme gene I/D polymorphisms with essential hypertension in Han Chinese population: a meta-analysis. *J Hypertens*. 2010 Mar; 28(3):419-428.
- <sup>119</sup> Jeunemaitre X, Lifton RP, Hunt SC, Williams RR, Lalouel JM. Absence of linkage between the angiotensin converting enzyme locus and human essential hypertension. *Nature Genet* 1992; 1: 72–75.
- <sup>120</sup> Gu XX, Spaepen M, Guo C, Fagard R, Amery A, Lijnen P, Cassiman JJ. Lack of association between the I/D polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene and essential hypertension in a Belgian population. *J Hum Hypertens* 1994; 8: 683–685.
- <sup>121</sup> Chiang FT, Lai ZP, Chern TH, Tseng CD, Hsu KL, Lo HM, Tseng YZ. Lack of association of the angiotensin converting enzyme polymorphism with essential hypertension in a Chinese population. *Am J Hypertens* 1997; 10: 197–201.
- <sup>122</sup> Xiaofeng Zhu, Nouridine Bouzekri, Lorraine Southam, Richard S. Cooper, Adebawale Adeyemo, Colin A. McKenzie, Anny Luke, Guangjie Chen, Robert C. Elston, and Ryk Ward. Linkage and Association Analysis of Angiotensin I - Converting Enzyme (ACE)-Gene Polymorphisms with ACE Concentration and Blood Pressure. *Am. J. Hum. Genet.* 68:1139-1148, 2001.
- <sup>123</sup> Saeed Mahmood M, Saboohi K, Osman Ali S, Bokhari AM, Frossard PM. Association of the angiotensin-converting enzyme (ACE) gene G2350A dimorphism with essential hypertension. *J Hum Hypertens* 2003; 17 (10) : 719-723.
- <sup>124</sup> Niu W, Qi Y, Hou S, Zhai X, Zhou W, Qiu C. Haplotype -based association of the renin-angiotensin-aldosterone system genes polymorphisms with essential hypertension among Han Chinese: the Fangshan study. *J Hypertens* 2009; 27: 1384-1391.
- <sup>125</sup> Wenquan Niu, Yue Qi, Pingfin Gao, Dingliang Zbu. Review: association between angiotensin converting enzyme G2350A polymorphism and hypertension risk: a meta-analysis. *Journal of the Renin Angiotensin Aldosterone System*. 2011; 12(1):8-14.

- 
- <sup>126</sup> Jeunemaitre X, Soubrier F, Kotelevtsev YV, Lifton RP, Williams CS, Charru A et al. Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen. *Cell* 1992; 71: 169-80.
- <sup>127</sup> Mohana VU, Swapna N, Surender RS, Vishnupriya S, Padma T. Gender-related association of AGT gene variants (M235T and T174M) with essential hypertension--a case-control study. *Clin Exp Hypertens*. 2012;34(1):38-44.
- <sup>128</sup> Niu T, Chen C, Yang J, Wang B, Wang Z, Schork N, Fang Z, Xu X. Blood pressure and the T174M and M235T polymorphisms of the angiotensinogen gene. *Ann Epidemiol*. 1999;9(4):245-53.
- <sup>129</sup> Kunz R, Kreutz R, Beige J, Distler A, Sharma AM. Association between the angiotensinogen 235T-variant and essential hypertension in whites: a systematic review and methodological appraisal. *Hypertension*. 1997;30(6):1331-7.
- <sup>130</sup> Kato N, Sugiyama T, Morita H, Kurihara H, Yamori Y, Yazaki Y. Angiotensinogen gene and essential hypertension in the Japanese: extensive association study and meta-analysis on six reported studies. *J Hypertens*. 1999;17(6):757-63.
- <sup>131</sup> Staessen JA, Kuznetsova T, Wang JG, Emelianov D, Vlietinck R, Fagard R. M235T angiotensinogen gene polymorphism and cardiovascular renal risk. *J Hypertens*. 1999 Jan;17(1):9-17
- <sup>132</sup> Bonnardeaux A, Davies E, Jeunemaitre X. Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism in human essential hypertension. *Hypertension* 1994; 24:63-69.
- <sup>133</sup> Wang WYS, Zee RYL, Morris BJ. Association of angiotensin II type I receptor gene polymorphism with essential hypertension. *Clin Genet* 1997; 51: 31-4.
- <sup>134</sup> Miyamoto Y, Yoshimasa T, Itoh H, Igaki T, Harada M, Yamashita, J et al. Association of angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism with essential hypertension in Japanese. *J. Hypertens* 1996; 14 (Suppl. 1): S29.
- <sup>135</sup> Takami S, Katsuya T, Rakugi H, Sato N, Nakata Y, Kamitani A et al. Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism is associated with increase of left ventricular mass but not with hypertension. *Am J Hypertens* 1998; 11: 316-21
- <sup>136</sup> Amant C, Hamon M, Bauters C, Richard F, Hlbecque N, McFadden EP et al. The angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism is associated with coronary artery vasoconstriction. *J Am Coll Cardiol* 1997; 29:486-490.
- <sup>137</sup> Van Geel PP, Pinto YM, Voors AA, Buikema H, Oosterga M, Crijns HJGM, van Gilst WH. Angiotensin II type 1 receptor A1166C gene polymorphism is associated with an increased response to angiotensin II in human arteries. *Hypertension*; 35:717-721, 2000
- <sup>138</sup> Brand E, Chatelain N, Mulatero P, et al: Structural analysis and evaluation of the aldosterone synthase gene in hypertension. *Hypertension* 1998; 32: 198–204.

- 
- <sup>139</sup> Grant FD, Romero JR, Jeunemaitre X, et al: Low-renin hypertension, altered sodium homeostasis, and an alpha-adducin polymorphism. *Hypertension* 2002; 39: 191–196
- <sup>140</sup> Matsuoka Y, Li X, Bennett V (2000) Adducin: structure, function and regulation. *Cell Mol Life Sci* 57: 884–895.
- <sup>141</sup> Lin B, Nasir J, McDonald H, Graham R, Rommens JM, et al. (1995) Genomic organization of the human alpha-adducin gene and its alternately spliced isoforms. *Genomics* 25: 93–99
- <sup>142</sup> Manunta P, Burnier M, D’Amico M, Buzzi L, Maillard M, Barlassina C, et al. Adducin polymorphism affects renal proximal tubule reabsorption in hypertension. *Hypertension* 1999;33:694-697.
- <sup>143</sup> Beeks E, Van Der Klauw MM, Kroon AA, Spiering W, Fuss-Lejeune MJ, de Leeuw PW. Adducin Gly460Trp polymorphism and renal hemodynamics in essential hypertension. *Hypertension*.2004;44:419-423.
- <sup>144</sup> Tamaki S, Iwai N, Tsujita Y, Nakamura Y, Kinoshita M. Polymorphism of alpha-adducin in Japanese patients with essential hypertension. *Hypertens Res*. 1998;21:29–32.
- <sup>145</sup> Casari G, Barlassina C, Cusi D. Association of the alphaadducin locus with essential hypertension. *Hypertension* 1995;25:320-6.
- <sup>146</sup> Barlassina C, Norton GR, Samani NJ, Woodwiss AJ, Candy GC, Radevski I, et al. Alpha-adducin polymorphism in hypertensives of South African ancestry. *Am J Hypertens* 2000;13:719-723.
- <sup>147</sup> Ju Z, Zhang H, Sun K, Song Y, Lu H, Hui R, et al. Alphaadducin gene polymorphism is associated with essential hypertension in Chinese: A case-control and family-based study. *J Hypertens* 2003;21:1861-1868.
- <sup>148</sup> Ishikawa K, Katsuya T, Sato N, Nakata Y, Takami S, Takiuchi S, Fu Y, Higaki J, Ogihara T. No association between alpha-adducin 460 polymorphism and essential hypertension in a Japanese population. *Am J Hypertens*. 1998;11:502–506.
- <sup>149</sup> Kato N, Sugiyama T, Nabika T, Morita H, Kurikara H, Yazaki Y, et al. Lack of association between the alpha-adducin locus and essential hypertension in a Japanese population. *Hypertension* 1998;31:730-733.
- <sup>150</sup> Larson N, Hutchinson R, Boerwinkle E. Lack of association of 3 functional gene variants with hypertension in African Americans. *Hypertension* 2000;35:1297-1300.
- <sup>151</sup> He X, Zhu DL, Chu SL, Jin L, Xiong MM, Wang GL, et al.  $\alpha$ -Adducin gene and essential hypertension in China. *Clin Exp Hypertens* 2001;23:579-589.
- <sup>152</sup> Hansson JH, Schild L, Lu Y, Wilson TA, Gautschi I, Shimkets R, Nelson-Williams C, Rossier BC, Lifton RP. A de novo missense mutation of the beta subunit of the epithelial sodium channel causes hypertension and Liddle syndrome, identifying a

---

proline-rich segment critical for regulation of channel activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995, 92:11495-11499.

<sup>153</sup> Strautnieks SS, Thompson RJ, Gardiner RM, Chung E. A novel splice-site mutation in the gamma subunit of the epithelial sodium channel gene in three pseudohypoaldosteronism type 1 families. *Nat Genet*. 1996;13:248–250

<sup>154</sup> Wong ZYH, Stebbing M, Ellis JA, Lamantia A, Harrap SB. Genetic linkage of beta and gamma subunit of epithelial sodium channel to systolic blood pressure. *Lancet*. 1999;353:1222–25.

<sup>155</sup> Iwai N, Baba S, Mannami T, Katsuya T, Higaki J, Ogihara T, et al. Association of Sodium Channel gamma -Subunit Promoter Variant With Blood Pressure. *Hypertension*. 2001;38:86-89.

<sup>156</sup> Persu A, Coscoy S, Houot AM, Corvol P, Barbry P, Jeunemaitre X. Polymorphism of the gamma subunit of the epithelial Na<sup>+</sup> channel in essential hypertension. *J Hypertens*. 1999;17: 639–45

<sup>157</sup> Fodinger M, Hirsch MM, Schedler D, Herkner H, Bur A, Laggner AN, Horl WH, Sunder-Plassmann G. Mutations in the carboxy terminus of the beta and gamma subunits of the epithelial sodium channel are not present in patients with hypertensive crisis. *Eur J Clin Invest*. 1998;28:707–11.

<sup>158</sup> Peng Y, Xue H, Luo L, Yao W, Li R. Polymorphisms of the beta1-adrenergic receptor gene are associated with essential hypertension in Chinese. *Clin Chem Lab Med*. 2009;47(10):1227-31.

<sup>159</sup> Wang H, Liu J, Liu K, Liu Y, Wang Z, Lou Y, et al.  $\beta$ 1-adrenoceptor gene Arg389Gly polymorphism and essential hypertension risk in general population: a meta-analysis. *Molecular Biology Reports*. 2013;40(6):4055-63.

<sup>160</sup> Leineweber K, Büscher R R, Bruck H, Brodde O E.  $\beta$ -Adrenoceptor polymorphisms. *Naunyn-Schmiedeberg Arch. Pharmacol*. 2004; 369, 1–22.

<sup>161</sup> Zaugg M., Schaub M. C. (2005). Genetic modulation of adrenergic activity in the heart and vasculature: Implications for perioperative medicine. *Anesthesiology* 102, 429–446.

<sup>162</sup> Cockcroft JR, Gazis AG, Cross DJ, Wheatley A, Dewar J, et al. (2000)  $\beta$ 2- adrenoceptor polymorphism determines vascular reactivity in humans. *Hypertension* 36: 371–375

<sup>163</sup> Lou Y, Liu J, Li Y, Liu Y, Wang Z, Liu K et al. Association study of the  $\beta$ 2-adrenergic receptor gene polymorphisms and hypertension in the Northern Han Chinese. *PLoS One*. 2011 Apr 5;6(4): e18590

<sup>164</sup> Farfel Z, Bourne HR, Iiri T. The expanding spectrum of G protein diseases. *N Engl J Med* 1999;340:1012-20.

- 
- <sup>165</sup> Milligan G, Kostenis E. Heterotrimeric G-proteins: a short 14. history. *Br J Pharmacol*. 2006;147:S46-55.
- <sup>166</sup> Bezerra MGT, Latronico AC, Fragoso MCBV. Tumores endócrinos associados às mutações das proteínas Gs alfa e Gi alfa2. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2005;49:784-90
- <sup>167</sup> McCuden CR, Hains MD, Kimple RJ, et al. G-protein signaling: back to the future. *Cell Mol Life Sci*. 2005; 62:551-7.
- <sup>168</sup> Hauache, Omar M. Receptores acoplados à proteína G: implicações para a fisiologia e doenças endócrinas. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2001, vol.45, n.3, pp.228-239.
- <sup>169</sup> Siffert W, Roskopf D, Siffert G, Busch S, Moritz A, Erbel R, Sharma AM, Ritz E, Wichmann H-E, Jakobs KH, Horsthemke B. Association of a human G-protein  $\beta 3$  subunit variant with hypertension. *Nat Genet*. 1998;18:45–48.
- <sup>170</sup> Adam V. Benjafield, Cheryl L. et al. G-Protein  $\beta 3$  Subunit Gene (GNB3) Variant in Causation of Essential Hypertension. *Hypertension*. 1998;32:1094-1097.
- <sup>171</sup> Meirhaeghe A, Bauters C, Helbecque N, et al. The human G-protein beta3 subunit C825T polymorphism is associated with coronary artery vasoconstriction. *European Heart Journal*. 2001 May;22(10):845-8
- <sup>172</sup> Li M, Zhang B1, Li C1, et al. G-protein beta 3 subunit polymorphisms and essential hypertension: a case-control association study in northern Han Chinese. *Journal of Geriatric cardiology*. 2015;12:127–134.
- <sup>173</sup> Zheng H, Xu H, Cui B, Xie N, Wang Z, Luo M. Association between polymorphism of the G-protein  $\beta 3$  subunit C825T and essential hypertension: an updated meta-analysis involving 36,802 subjects. *Biol Res*. 2013. 46:265–273.
- <sup>174</sup> Mei Li, Bei Zhang, Chuang Li, Jie-Lin Liu, Li-Juan Wang, Ya Liu, Zuo-Guang Wang, and Shao-Jun Wen. G-protein beta 3 subunit polymorphisms and essential hypertension: a case-control association study in northern Han Chinese. *J Geriatr Cardiol*. 2015 Mar; 12(2): 127–134.
- <sup>175</sup> Hemimi et al. Prediction of the risk for essential hypertension among Carriers of C825T Genetic Polymorphism of G Protein  $\beta 3$  (GNB3) Gene. *Biomarker Insights* 2016;11 69–75.
- <sup>176</sup> Ko KD, Kim KK, Suh HS, Hwang IC. Associations between the GNB3 C825T polymorphism and obesity-related metabolic risk factors in Korean obese women. *J Endocrinol Invest*. 2014;37(11):1117–20.
- <sup>177</sup> Fang L, Zhou C, Bai S, et al. The C825T polymorphism of the G-protein  $\beta 3$  gene as a risk factor for depression: a meta-analysis. *PLoS One*. 2015;10(7): e 0132274.
- <sup>178</sup> Semplicini A, Grandi T, Sandonà C, Cattelan A, Ceolotto G. G-protein  $\beta 3$ -subunit gene C825T polymorphism and cardiovascular risk: an updated review. *High Blood Press Cardiovasc Prev*. 2015;22(3):225–32.

- 
- <sup>179</sup> Brand E, Herrmann SM, Nicaud V et al. The 825C/T polymorphism of the G-protein subunit,  $\beta 3$  is not related to hypertension. *Hypertension* 1999; 33: 1175-1178.
- <sup>180</sup> Kato N, Sugiyama T, Morna H, Kurihara H, Yamori Y, Yazaki Y. G protein  $\beta 3$  subunit variant and essential hypertension in Japanese. *Hypertension* 1998; 32: 935-938.
- <sup>181</sup> Guo L, Zhang LL, Zheng B, Liu Y, Cao XJ, Pi Y. et al. The C825T polymorphism of the G-protein  $\beta 3$  subunit gene and its association with hypertension and stroke: an updated meta-analysis. *Plos One*. June 14, 2013;8(6)
- <sup>182</sup> Xi B, Tang W, Wang Q. Polymorphism near the ATP2B1 gene is associated with hypertension risk in East Asians: a meta-analysis involving 15 909 cases and 18 529 controls. *Blood Press*. 2012 Apr;21(2):134-8.
- <sup>183</sup> <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CYP17A1>
- <sup>184</sup> Sober S, Org E, Kepp K, et al. Targeting 160 Candidate Genes for Blood Pressure Regulation with a Genome-Wide Genotyping Array. Reif A, ed. *PLoS ONE*. 2009;4(6):e 6034.
- <sup>185</sup> Jorge Polonia, Luís Martins, et al. Prevalence, awareness, treatment and control of hypertension and salt intake in Portugal: changes over a decade. The PHYSA study. *J Hypertens* 2014; 32:1211–1221.
- <sup>186</sup> National Heart, Lung and Blood Institute. Factbook fiscal year 1966. Bethesda, Md: NHLBI; 1996.
- <sup>187</sup> Lewington S, Clarke P, Qizilbash, N e col. Prospective Studies Collaboration. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *Lancet* 2002; 360:1903-1913.
- <sup>188</sup> Gong M, Hubner N. Molecular genetics of human hypertension. *Clin Sci* 2006;110:315-26.
- <sup>189</sup> Lifton RP. Molecular genetics of human blood pressure variation. *Science* 1996;272:676-80.
- <sup>190</sup> O'Shaughnessy KM (2001) The genetics of essential hypertension. *Br J Clin Pharmacol* 51: 5–11.
- <sup>191</sup> Harrap SB. Blood pressure genetics: time to focus. *J Am Soc Hypertens*. 2009 JulAug;3(4):231-7.
- <sup>192</sup> I Mendonça, R Palma dos Reis, AC Sousa, AI Freitas, S Freitas, S Gomes, P Faria, E Pereira, JÁ Silva, S Sousa, G Caíres, JJ Araújo, A Drumond, J Sousa, I Ornelas, A Brehm, A Cardoso. Os genes do sistema Renina-Angiotensina, influenciam o aparecimento de doença das artérias coronárias de forma independente. Prémio Delta de Cardiopatía Isquémica instituído pela Sociedade Portuguesa de Cardiologia 2004.

- 
- <sup>193</sup> Ortega E, Fernandez- Aceituno AM, Esparragón F R, Perera OH, Nuez FM et al. The involvement of the renin- angiotensin system gene polymorphisms in coronary heart disease. *Rev Esp Cardiol* 2002;55(2):92-9.
- <sup>194</sup> Direcção Regional de Estatística da Ilha da Madeira <http://estatística.gov-madeira.pt>; 8/8/2017 – 14 horas.
- <sup>195</sup> National Institute of Health, National Heart, Lung, and Blood Institute North American Association for the Study of Obesity. The Practical Guide: Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight and Obesity in Adults. *NHLBI Obesity Education Initiative, NIH Publication Number: 00-4084*, 2000.
- <sup>196</sup> Asmar R, Benetos A, Topouchian J, Laurent P, Pannier B, Brisac A-M, Target R, Levy BI: Assessment of arterial distensibility by automatic pulse wave velocity measurement: validation and clinical application studies. *Hypertension* 1995; **26**:485–490.
- <sup>197</sup> Harrisson's principles of Internal Medicine 19<sup>a</sup> ed. Capitulo 61: 289-295. 2015. New York.
- <sup>198</sup> European Guidelines on Cardiovascular disease prevention in clinical practice. *European Heart Journal*. 2016; 37(29)2315-2381.
- <sup>199</sup> American Diabetes Association. Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care* 2017;40(Suppl. 1):S11–S24
- <sup>200</sup> Reynolds K, Lewis B, Nolen JD, Kinney GL, Sathya B, He J: Alcohol consumption and risk of stroke: a meta-analysis. *JAMA* 2003;289:579-588.
- <sup>201</sup> Harrisson's Principles of Internal Medicine 19<sup>a</sup> ed. Capitulo 61: 1799-1874
- <sup>202</sup> Sherif F. Nagueh, Chair , Otto A. Smiseth, Co-Chair, , Christopher P. Appleton, Benjamin F. Byrd, Hisham Dokainish, Thor Edvardsen, et al Recommendations for the Evaluation of Left Ventricular Diastolic Function by Echocardiography: An Update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *J Am Soc Echocardiogr* 2016;29:277-314.
- <sup>203</sup> Thomas H. Marwick, Thierry C. Gillebert, Gerard Aurigemma, Julio Chirinos, Genevieve Derumeaux, et al. Recommendations on the Use of Echocardiography in Adult Hypertension: A Report from the European Association of Cardiovascular Imaging (EACVI) and the American Society of Echocardiography (ASE). *Journal of the American Society of Echocardiography*. 2015; 28:727-54
- <sup>204</sup> Keith NM, Wagener HP, Barker NW. Some different types of essential hypertension: their course and their prognosis. *Am J Med Sci* 1939;197:332-43.
- <sup>205</sup> Harrisson's Principles of Internal Medicine 19<sup>a</sup> ed. Capitulo 61: 2535-2732
- <sup>206</sup> Int J Mol Epidemiol Genet 2015;6(1):1-8 [www.ijmeg.org](http://www.ijmeg.org) /ISSN:1948-1756/IJMEG0012842

- 
- <sup>207</sup> Yoo W, Smith SA, Coughlin SS. Evaluation of genetic risk scores for prediction of dichotomous outcomes. *International Journal of Molecular Epidemiology and Genetics*. 2015;6(1):1-8.
- <sup>208</sup> Magdalena Szumilas, MSc. Explaining Odds Ratios. *J Can Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2010 Aug; 19(3): 227–229
- <sup>209</sup> Hoffee PA, 2000, “Genética Médica Molecular”, Guanabara Koogan Edição, Oxford, Blackwell Science Limited.
- <sup>210</sup> Ritchie MD, Hahn LW, Roodi N, Bailey LR, Dupont WD, Parl FF, et al., "Multifactor-dimensionality reduction reveals high-order interactions among estrogen-metabolism genes in sporadic breast cancer", *Am.J Hum. Genet.* 2001; 69, n.1:138-147.
- <sup>211</sup> Motsinger A A, Ritchie M D. Multifactor dimensionality reduction: An analysis strategy for modelling and detecting gene–gene interactions in human genetics and pharmacogenomics studies. *Hum Genomics*. 2006; 2(5): 318–328.
- <sup>212</sup> Glavnik N, Petrovic D. M235T polymorphism of the angiotensinogen gene and insertion/deletion polymorphism of the angiotensina-1 converting enzyme gene in essential arterial hypertension in Caucasians. *Folia Biol*. 2007;53:69-70.
- <sup>213</sup> Jian-Fei C, Jun J, Hu T, Min-Bao S, Shi-Yong Y, Lan H: Lack of associaton of CYP11b2-344C/T polymorphism with essential hypertension: a metanalysis. *Int J Clin Exp Med* 2015;8(6):9162-67.
- <sup>214</sup> Lou Y, Liu J, Huang Z, Liu Y, Li Z, Li Y, Xie Y, Wen S. A46G and C79G polymorphisms in the beta2-adrenergic receptor gene (ADRB2) and essential hypertension risk: A meta-analysis. *Hypertens Res*. 2010;33:1114-23.
- <sup>215</sup> Söber S, Org E, Kepp K, et al. Targeting 160 Candidate Genes for Blood Pressure Regulation with a Genome-Wide Genotyping Array. Reif A, ed. *PLoS ONE*. 2009;4(6)e6034.
- <sup>216</sup> Tabara Y, Kohara K, Kita Y, et al. Common Variants in the ATP2B1 Gene Are Associated With Susceptibility to Hypertension: The Japanese Millennium Genome Project. *Hypertension*. 2010;56(5):973-980.
- <sup>217</sup> Laurent S, Cockcroft J, Van Bortel L, Boutouyrie P, Giannattasio C, Hayoz D, et al. Expert consensus document on arterial stiffness: methodological issues and clinical applications. *Eur Heart J*. 2006;27(21):2588-605.
- <sup>218</sup> Pizzi O, Brandão A A, Campos Magalhães ME, Pozzan R, Brandão AP. Velocidade de onda de pulso – o método e suas implicações prognósticas na hipertensão. Arterial Pulse wave velocity – methodology and prognostic implications in hypertension. *Rev Bras Hipertens*. 2006. 13(1): 59-62.
- <sup>219</sup> Coban E, Ozdoğan M, Akçit F. Levels of plasma fibrinogen and D-dimer in subjects with white-coat hypertension. *J Hum Hypertens*. 2004;18(4):291-2.



- 
- <sup>220</sup> Manunta P, Barlassina C, Bianchi G. Adducin in essential hypertension. *FEBS Letters* 430: 1998; 41- 44.
- <sup>221</sup> Schiffrin EL. Intracellular signal transduction for vasoactive peptides in hypertension. *Can J Physiol Pharmacol.* 1994;72:954–62
- <sup>222</sup> Taal HR, Verwoert GC, Demirkan A, et al. Genome-wide profiling of blood pressure in adults and children. *Hypertension.* 2012; 59:241–247.
- <sup>223</sup> Cheung BM. The hypertension-diabetes continuum. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2010; 55: 333–9.
- <sup>224</sup> Tso AW, Sham PC, Wat NM, et al. Polymorphisms of the gene encoding adiponectin and glycaemic outcome of Chinese subjects with impaired glucose tolerance: a 5-year follow-up study. *Diabetologia.* 2006; 49:1806–15.
- <sup>225</sup> Gress TW, Nieto FJ, Shahar E, et al. Hypertension and antihypertensive therapy as risk factors for type 2 diabetes mellitus. Atherosclerosis Risk in Communities Study. *N Engl J Med.* 2000; 342:905–12.
- <sup>226</sup> Sowers JR. Insulin resistance and hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;286:H1597–1602.
- <sup>227</sup> Swers JR. Insulin resistance and hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;286:H1597–1602.
- <sup>228</sup> Sousa AC, Mendonça MI, Pereira A, Gouveia S, Freitas AI, Guerra G, Góis T, Rodrigues M, Henriques E, Freitas S, Borges S, Pereira D, Brehm A, Palma dos Reis R. Synergistic association of genetic variants with environmental risk factors in susceptibility to essential hypertension. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2017
- <sup>229</sup> Jones DW, Miller ME, Wofford MR, Anderson DC Jr, Cameron ME, Willoughby DL, Adair CT, King NS. The effect of weight loss intervention on antihypertensive medication requirements in the hypertension Optimal Treatment (HOT) study. *Am J Hypertens.* 1999; 12:1175–1180. 9).
- <sup>230</sup> O'Donnell CJ, Lindpaintner K, Larson MG, Rao VS, Ordovas JM, Schaefer EJ, Myers RH, Levy D. Evidence for association and genetic linkage of the angiotensin-converting enzyme locus with hypertension and blood pressure in men but not women in the Framingham Heart Study [see comments]. *Circulation* 1998; 97 (18): 1766–1772.
- <sup>231</sup> M. Das, S. Pal, and A. Ghosh, “Angiotensin converting enzyme gene polymorphism (Insertion/Deletion) and hypertension in adult Asian Indians: a population-based study from Calcutta, India”. *Human Biology.* 2008. 80, no. 3, pp. 303– 12.
- <sup>232</sup> Benjafield AV, Jeyasingam CI, Nyholt DR, Griffiths LR, Morris BJ. G protein  $\beta 3$  subunit gene (GNB3) variant in causation of essential hypertension. *Hypertension.* 1998; 32:1094–7.

- 
- <sup>233</sup> Beige J, Hohenbleicher H, Distler A, Sharma AM. G protein beta-3 subunit C 825T variant and ambulatory blood pressure in essential hypertension. *Hypertension*. 1999;33:1049–51.
- <sup>234</sup> Cusi D, Barlassina C, Azzani T, et al. Polymorphisms of alpha-adducin and salt sensitivity in patients with essential hypertension. *Lancet*. 1997;349:1353–1357.
- <sup>235</sup> Vanessa Fontana, PhD; Caitrin W. McDonough; Yan Gong, PhD; Nihal M. El Rouby; Ana Caroline C. Sa; Kent D. Taylor; Y.-D. Ida Chen; John G. Gums; Arlene B. Chapman; Stephen T. Turner; Carl J. Pepine; Julie A. Johnson; Rhonda M. Cooper-DeHoff. *J Am Heart Assoc*. 2014;3: e001398.
- <sup>236</sup> Pickering GW: The genetic factor in essential hypertension. *Ann Intern Med*. 1955, 43:457- 464.
- <sup>237</sup> Ehret GB, Munroe PB, Rice KM, et al. Genetic variants in novel pathways influence blood pressure and cardiovascular disease risk. *Nature*. 2011; 478:103–109. [PubMed: 21909115] (22).
- <sup>238</sup> Fava C, Sjogren M, Montagnana M, et al. Prediction of blood pressure changes over time and incidence of hypertension by a genetic risk score in Swedes. *Hypertension*. 2013; 61:319–326. [PubMed: 23232644].
- <sup>239</sup> Fava C, Montagnana M, et al. Subjects heterozygous for genetic loss of function of the thiazide-sensitive cotransporter have reduced blood pressure. *Hum Mol Genet*. 2008;17:413–418. 36.
- <sup>240</sup> Ji W, Foo JN, O’Roak BJ, Zhao H, Larson MG, Simon DB, Newton-Cheh C, State MW, Levy D, Lifton RP. Rare independent mutations in renal salt handling genes contribute to blood pressure variation. *Nat Genet*. 2008;40:592–599.